



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ISABELA CAMARGO

**ANÁLISE DA FUNÇÃO DO GENE *SSA_0094* NA FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *STREPTOCOCCUS SANGUINIS***

PIRACICABA

2021

ISABELA CAMARGO

**ANÁLISE DA FUNÇÃO DO GENE *SSA_0094* NA FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *STREPTOCOCCUS SANGUINIS***

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: Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA ISABELA CAMARGO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

PIRACICABA

2021

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

C14a Camargo, Isabela, 1994-
Análise da função do gene ssa_0094 na formação de biofilme por
Streptococcus sanguinis / Isabela Camargo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos Graner.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilmes. 2. *Streptococcus sanguinis*. I. Mattos-Graner, Renata de
Oliveira, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Analysis of the function of the ssa_0094 gene in biofilm formation by
Streptococcus sanguinis

Palavras-chave em inglês:

Biofilms

Streptococcus sanguinis

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 17-05-2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Sandra Camargo, quem sempre me incentivou a buscar conhecimento e esteve comigo nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai, Antônio Camargo, e à minha mãe, Sandra Camargo, os quais nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar qualquer sonho, incluindo o de estudar na UNICAMP. Sempre estiveram ao meu lado, guiando, ensinando e apoiando. Eu jamais poderia ter melhores pais.

Agradeço à minha irmã, Gabriela Camargo, por todo o companheirismo, apoio, amor, carinho, alegrias e por todas as risadas que vivemos juntas.

Agradeço também à toda minha família que sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso, principalmente a minha avó, Benedita, por toda a proteção divina e paz, meus tios Andréia e Cláudio que sempre tiveram palavras sábias e de carinho que acalmaram meu coração. Agradeço aos meus tios Sílvia, Carlos e Meri que sempre estiveram dispostos a correr comigo atrás do meu sonho.

Agradeço à Professora Renata de Oliveira Mattos Graner por ter me orientado e dado a oportunidade de conhecer o que é pesquisar, agradeço imensamente à Livia Araújo Alves por ter me orientado durante estes anos com tanto carinho e devoção. Sempre serei muito grata por tudo o que me ensinaram.

Agradeço imensamente aos amigos que encontrei na faculdade, meus dias não seriam felizes sem eles, Rodrigo de Lima, Mateus Pavarin, Izabella Baesteiro, Karen Miwa, Rebeca Waisman, Maria Eduarda Wernec, Matheus Nunes, Lucas Diehl.

Agradeço a todos os meus professores que transmitiram o conhecimento que tenho hoje, especialmente a professora Ana Cláudia Rossi, Alan Roger, José Flávio Almeida, Francisco Groppo e Luciana Asprino.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do auxílio à pesquisa (proc. 2018/02054-4), e bolsa de Iniciação científica (proc. 2017/23183-4). A Dra. Livia A. Alves foi também financiada através da bolsa de pós-doutorado da FAPESP (proc. 2017/19899-4).

RESUMO

Streptococcus sanguinis é uma espécie comensal comum em biofilmes dentários, capaz de inibir a colonização por espécies cariogênicas e de liberar DNA genômico extracelular (DNAe) para formar biofilmes. O gene *ssa_0094* de *S. Sanguinis* codifica uma hidrolase de mureína e é regulado pelo sistema de dois componentes VicRK. Este estudo investigou a função do gene *ssa_0094* na produção de DNAe e na formação de biofilmes por *S. sanguinis*. Para isto, *ssa_0094* foi inativado na cepa de *S. sanguinis* SK36 por recombinação homóloga com um alelo nulo, para produzir a mutante isogênica SK0094. SK0094 foi complementada com uma cópia episomal de *ssa_0094* gerando a cepa SK0094+. SK0094 foi comparada com SK36 e SK0094+ em análises de curvas de crescimento em BHI, produção de DNAe e formação de biofilme. Quantidades de DNAe foram quantificadas em sobrenadantes de culturas planctônicas através de qPCR com *primers* para o gene *16SrRNA*. Biofilmes foram obtidos em microplacas de poliestireno durante 18h de incubação em diferentes meios de cultura. Análises de quantificação de DNAe em culturas planctônicas mostraram que a inativação do gene *ssa_0094* promove maior liberação de DNAe no mutante SK0094 comparado com a cepa SK36 ($p<0.05$), enquanto a cepa complementada SK0094+ tem a produção de DNAe semelhante à SK36. Entretanto, a inativação de *ssa_0094* promoveu pequena redução, mas significativa, na formação de biofilmes em meio BHI com sacarose suplementado ou não com saliva humana durante 18h de incubação ($p<0.05$). Os dados obtidos revelam que a inativação de *ssa_0094* promove maior produção de DNAe, mas compromete a maturação de biofilmes por *S. sanguinis*. Assim estudos funcionais da proteína *ssa_0094* poderão fornecer informações importantes sobre o papel do DNAe e da homeostase da parede celular na formação e maturação de biofilmes por *S. sanguinis*. Estudo financiado pela FAPESP (Proc. 2018/02054-4; 2017/23183-4; 2017/19899-4).

Palavras-chave: Biofilme. Mecanismos de virulência. *Streptococcus sanguinis*. Hidrolase de mureína. Microorganismos bucais. Genética recombinante.

ABSTRACT

Streptococcus sanguinis is a common commensal specie on dental biofilms, capable of inhibiting colonization by cariogenic species, in addition to releasing extracellular genomic DNA (eDNA) to form biofilms. The gene *ssa_0094* encodes for a murein hydrolase of *S. sanguinis* and is regulated by the VicRK two-component system. This study investigates functions of *ssa_0094* in the production of eDNA and biofilm formation in *S. sanguinis*. To that purpose, *ssa_0094* was inactivated in *S. sanguinis* strain SK36 by double cross-over recombination with a null allele, to yield SK0094 isogenic mutant. A complemented mutant harboring an episomal copy of *ssa_0094* was also obtained (SK0094+). SK0094 was compared to SK36 and SK0094+ in analyses of growth curves in BHI, production of eDNA and biofilm formation. Amounts of eDNA were quantified in culture supernatants of planktonic cultures by qPCR with primers for *16SrRNA* gene. Biofilms were obtained in polystyrene microwell plates during 18h of growth in different media. The isogenic *ssa_0094* mutant showed increased production of eDNA compared to SK36 ($p<0.05$), whereas production of eDNA by the complemented mutant was similar to that observed for SK36. On the other hand, the *ssa_0094* mutant showed slight, although statistically significant, reduction in biofilm formation during 18h of growth ($p<0.05$). These results show that deletion of *ssa_0094* promotes increased production of DNAe, but compromises biofilm maturation in *S. sanguinis* SK36. These findings indicate that functional studies of *ssa_0094* protein may provide important information about the roles of DNAe production and cell wall homeostasis in biofilm formation and maturation in *S. sanguinis*. This study was supported by FAPESP (grant number proc. 2018/02054-4; 2017/23183-4; 2017/19899-4).

Keywords: Biofilm. Virulence mechanism. *Streptococcus sanguinis*. Murein hydrolase. Oral microorganisms. Recombinant genetics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 <i>Streptococcus sanguinis</i> como espécie pioneira dos biofilmes dentários	11
2.2 Os sistemas de dois componentes VicRK de <i>S. sanguinis</i> como regulador da formação de biofilme e da liberação de DNA genômico	12
3 PROPOSIÇÃO	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Cepas estudadas, plasmídeos e condições de cultivo	15
4.2 Construção da cepa mutante isogênica de <i>ssa_0094</i>	15
4.3 Ensaios de complementação da cepa mutante	18
4.4 Construção de plasmídeo auto-replicativo para complementação da mutante SK0094	20
4.5 Extração de RNA e conversão em cDNA para confirmação da complementação da cepa SK0094+ por RT-qPCR	21
4.6 Confirmação da complementação da cepa complementada SK0094+ por RT-qPCR	23
4.7 Quantificação de DNA extracelular em sobrenadantes de cultura entre as cepas <i>S. sanguinis</i> parental SK36 e as mutantes isogênica e complementada de <i>ssa_0094</i>	24
4.8 Comparação das curvas de crescimento entre as cepas parental, mutante SK0094 e complementada SK0094+	25

4.9 Análise de formação de biofilmes <i>in vitro</i> em placas de poliestireno	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Análise das curvas de crescimento das cepas SK36, SK0094 e SK0094+ em meio BHI sob atmosfera de aerobiose e 10% de CO ₂	27
5.2 Análise de microscopia de luz da morfologia e arranjo celular das cepas SK36, SK0094 e SK0094+	28
5.3 A inativação de <i>ssa_0094</i> promove maior liberação de DNAe em culturas planctônicas nas fases exponencial e estacionária de crescimento	29
5.4 A inativação do gene <i>ssa_0094</i> diminui significativamente a formação de biofilmes em <i>S. sanguinis</i>	30
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXOS	37
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	37
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	38
Anexo 3 – Iniciação Científica	39

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus sanguinis é a espécie pioneira na colonização de biofilmes dentários e encontra-se principalmente em biofilmes associados à saúde. Esta espécie é mais abundante em biofilmes dentários, o que indica a necessidade de formar biofilmes para sua permanência na cavidade bucal. Para começar o processo de colonização dos dentes, é preciso que ocorra a ligação entre *S. sanguinis* e a película adquirida presente na superfície dentária. Sabe-se que logo após a adesão inicial, esta espécie produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), quando está sob condições de aerobiose. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é capaz de induzir a liberação de DNA genômico (principal polímero encontrado na matriz extracelular nos estágios iniciais da formação de biofilmes), além de impedir que espécies de bactérias patógenas possam colonizar este sítio. Sugere-se que H_2O_2 induz a expressão e/ou atividade de hidrolases de peptideoglicano nesta espécie, as quais estão supostamente envolvidas na liberação de DNA genômico durante o crescimento bacteriano. Sendo assim, a produção de H_2O_2 e a liberação de DNA genômico são importantes para a formação de biofilme por *S. sanguinis*.

As bactérias apresentam sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC), os quais são responsáveis por detectar estímulos e ativar ou reprimir a transcrição de genes específicos. O genoma da cepa *S. sanguinis* SK36 apresenta 14 SDC, sendo um destes o VicRK_{SS}, responsável por regular a divisão da parede celular. Foi identificado que a inativação deste gene (VicRK) reduz significativamente a produção de H_2O_2 , a liberação de DNA genômico e também a formação de biofilme na cepa *S. sanguinis* SK36. Além disso, verificamos que a inativação de VicRK_{SS} reduz a transcrição de *ssa_0094*, este gene codifica uma proteína com função ainda desconhecida, mas com homologia a enzimas capazes de interagir e/ou hidrolisar peptideoglicano, o principal componente da parede celular de bactérias Gram-positivas, como estreptococos.

Neste estudo trabalhamos com a hipótese de que *ssa_0094* esteja envolvido na liberação de DNA genômico através da clivagem de peptideoglicano durante o crescimento em fase plactônica ou em biofilmes. Para isto, construímos uma cepa mutante isogênica de *ssa_0094* em SK36, a qual foi designada SK0094 e comparamos a produção de DNA extracelular em sobrenadantes de cultura planctônica e a formação de biofilmes *in vitro* desta mutante com a cepa parenteral SK36. A cepa mutante SK0094 complementada com cópia episomal de *ssa_0094* (designada SK0094+) foi também avaliada, para a confirmação do papel de *ssa_0094* nos fenótipos observados em SK0094.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Streptococcus sanguinis* como espécie colonizadora pioneira dos dentes

Streptococcus sanguinis é uma espécie bacteriana ubíqua e abundante da cavidade bucal, cujo nicho primário são as superfícies dentárias. Cepas desta espécie são colonizadoras pioneiras dos dentes e encontra-se em maior proporção em biofilmes dentários associados à saúde, quando comparados a biofilmes cariogênicos (Ge et al., 2008; Giacaman et al., 2014). Sabe-se que a espécie *S. sanguinis* se comporta de maneira diferente de outras espécies comensais que colonizam diversas superfícies orais como mucosas e superfícies dentárias, como por exemplo *Streptococcus mitis*. A espécie *S. sanguinis* é pouco detectada em mucosas, concentrando-se em superfícies dentárias. Assim, sua permanência na cavidade oral é dependente da sua capacidade de formar biofilmes na superfície dentária (Kreth et al., 2017). Uma vez que essa espécie começa a se aderir à película adquirida das superfícies dentárias, também produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 inibe o crescimento de bactérias patogênicas competidoras, dificultando sua fixação às superfícies dos dentes. Espécies patogênicas inibidas por H_2O_2 incluem *Streptococcus mutans* (um patógeno da cárie dentária) e *Porphyromonas gingivalis* (um patógeno da doença periodontal). Além de *S. sanguinis* ser uma espécie de bactéria comensal, a mesma também é um patógeno oportunista quando presente na circulação sanguínea, podendo causar quadros de endocardites infecciosas (Douglas et al., 1993; Di et al., 2006).

O início da colonização dos dentes por *S. sanguinis* envolve sua ligação mediada por adesinas à película adquirida presente na superfície do esmalte do dente. A película adquirida é formada principalmente por proteínas humanas solúveis encontradas na saliva e dos tecidos epiteliais, assim como por algumas proteínas microbianas (Lee et al., 2013). O motivo pelo qual *S. sanguinis* se liga com alta facilidade e afinidade à película adquirida não é conhecido. No entanto, coincidentemente os genomas desta espécie se caracterizam por conter genes que codificam grande diversidade de proteínas da parede celular, as quais poderiam funcionar como adesinas (Xu et al., 2007; Nobbs et al., 2009; Kreth et al., 2017). Além disso, sabemos que quando *S. sanguinis* encontra-se em maior tensão de oxigênio, é capaz de produzir peróxido de hidrogênio. Por sua vez, H_2O_2 induz a liberação de DNA genômico (principal composto da matriz extracelular de biofilmes formados por *Streptococcus sanguinis*), além de inibir o crescimento de bactérias competidoras (Kreth et al., 2009; Moraes et al., 2014). A relação entre a produção de H_2O_2 e a liberação de DNA genômico ainda não foi esclarecida, mas foi proposto que o peróxido de hidrogênio induz hidrolases de peptideoglicano, os quais estão possivelmente envolvidos na liberação moderada de DNA

genômico (Kreth et al., 2009). Observa-se também que *S. sanguinis* não necessita da síntese de glucanos insolúveis para formar biofilmes dentários (Hamada et al., 1980; Yoshida et al., 2014), diferente da espécie *S. mutans* que produz polissacarídeos insolúveis a partir da fermentação da sacarose. Assim, *S. sanguinis* precisa da liberação de DNA genômico para formar biofilmes, o que é demonstrado quando se inibe experimentalmente a formação de biofilme por esta espécie através da suplementação de meio de cultura com enzima DNase I (Moraes et al., 2014). Sendo assim, a produção de H_2O_2 e consequente liberação de DNA genômico são de extrema importância para que *Streptococcus sanguinis* possa formar biofilme.

2.2 O sistema de dois componentes VicRK de *S. sanguinis* como regulador da formação de biofilme e da liberação de DNA genômico

Bactérias utilizam sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC) para detectar estímulos externos e ativar ou reprimir a transcrição de genes específicos para adaptação a estes estímulos. Um SDC típico consiste de uma proteína de membrana (normalmente uma histidina quinase, K), a qual se autofosforila quando ativada por sinais ambientais, e transfere então o grupo fosfato a uma proteína reguladora intracelular cognata denominada regulador de resposta (R) (Capra et al., 2012; Mattos-Graner et al., 2017). Uma vez fosforilado, o R tem sua conformação alterada, sendo capaz de se ligar às sequências reguladoras dos seus genes alvos, ativando ou inibindo a transcrição destes.

O genoma da cepa *S. sanguinis* SK36 apresenta um total de 14 SDC, os quais incluem um SDC altamente conservado entre bactérias do filo Firmicutes, designado VicRK também conhecido como WalkR ou YycFG (Dubrac et al., 2008; Mattos-Graner et al., 2017). O sistema VicRK (Vic de virulence control) tem recebido atenção como um importante alvo terapêutico para controle de infecções por patógenos Gram-positivos, incluindo-se espécies do gênero *Streptococcus* (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*) e *Staphylococcus aureus*, porque além de regular fatores de virulência e escape a fatores imunológicos em estreptococos, também regula divisão e a homeostase da parede celular, processos essenciais para a viabilidade bacteriana (Dubrac et al., 2008).

Em *S. sanguinis*, verificamos que a inativação de VicRK_{SS} reduz drasticamente a produção de H_2O_2 , a liberação de DNA genômico e a formação de biofilmes na cepa *S. sanguinis* SK36 (Moraes et al., 2014). Através de ensaios de EMSA (electrophoretic mobility shift assays) e RT-qPCR, verificamos que VicRK_{SS}, se liga às sequências reguladoras do gene *spxB*, o qual codifica enzima piruvato oxidase requerida para a produção de H_2O_2 , e outros

genes que codificam potenciais hidrolases de mureína, incluindo-se o gene *ssa_0094*. A inativação de VicRK_{SS} promove uma redução de cerca de 10 vezes na transcrição de *ssa_0094*, indicando que este gene é induzido diretamente por VicRK_{SS}. Embora ainda apresente uma função desconhecida, a proteína de 365 aminoácidos codificada pelo gene *ssa_0094*, apresenta um domínio LysM (posição 52 a 96), sendo este domínio característico de proteínas que interagem ou clivam o peptideoglicano.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi investigar a função do gene *ssa_0094* na produção de eDNA e na formação de biofilmes em *S. sanguinis*.

Para isto, os objetivos específicos deste projeto incluem:

- a) Construir um mutante isogênico de *ssa_0094* a partir da cepa *S. sanguinis* SK36 e um mutante complementado com cópia episomal de *ssa_0094* em plasmídeo auto-replicativo.
- b) Comparar a quantidade de DNA extracelular em sobrenadantes de cultura entre as cepas *S. sanguinis* parental SK36 e as mutantes isogênicas e complementadas de *ssa_0094*.
- c) Comparar a capacidade de formação de biofilmes entre as cepas parental e mutantes em ensaios *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas estudadas, plasmídeos e condições de cultivo

A cepa *S. sanguinis* SK36, cujo genoma é conhecido (Xu *et al.*, 2007) e na qual determinamos funções do SDC VicRK_{SS} (Moraes *et al.*, 2014), foi utilizada para a construção da mutante isogênica de *ssa_0094*, designada SK0094. O plasmídeo auto-replicativo em *S. sanguinis* pDL278 (o qual contém o gene de resistência à espectinomicina) foi utilizado para a clonagem de *ssa_0094*, para a construção de vetor de complementação da cepa SK0094. As cepas *S. sanguinis* foram cultivadas a 37°C em BHI (Merck Labs, Alemanha) acrescidos ou não de eritromicina (10 µg/mL) ou espectinomicina (200 µg/mL) em atmosfera de 10% de CO₂, ou aerobiose sob agitação (150 rpm). A cepa de *Escherichia coli* DH5 foi utilizada para propagação de plasmídeos, sendo incubada a 37°C sob aerobiose, em meio Luria Bertani (LB) (Difco Labs, EUA), acrescido de 100 µg/mL de eritromicina ou espectinomicina (200 µg/mL) para construção das cepas mutantes e complementadas, respectivamente.

4.2 Construção da cepa mutante isogênica de *ssa_0094*

A cepa mutante SK0094 foi construída através da deleção do gene *ssa_0094* em SK36, utilizando-se um alelo mutado construído através de estratégia de PCR e ligação (*PCR ligation mutagenesis*) (Moraes *et al.*, 2014).

Foram desenhados *primers* (Tabela 1) para as regiões flanqueando *ssa_0094* designados *primers* 94P1, 94P2, 94P3 e 94P4. Os *primers* 94P2 e 94P3 contêm nas suas extremidades 5', as sequências dos sítios de restrição das endonucleases *Ascl* e *FseI*, respectivamente. O gene de resistência à eritromicina (*erm'*) foi amplificado do plasmídeo pVA838 através dos pares de *primers* E1 e E2, os quais contêm na sua extremidade 5', os sítios de restrição de *Ascl* e *FseI*, respectivamente. O tamanho esperado dos amplicons e a especificidade das reações foram monitoradas em géis de agarose corados com brometo de etídio, como ilustrado na Figura 1A. Os produtos das reações de PCR com os pares de *primers* 94P1/94P2, 94P3/94P4 e E1/E2 foram purificados e posteriormente submetidos à digestão com as endonucleases *Ascl*, *XhoI* (New England BioLabs, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. A integridade dos produtos digeridos foi monitorada em géis de agarose (Figura 1B). Os produtos foram então purificados e ligados em reações catalisadas pela DNA ligase T4 (Life Technologies, E.U.A.), segundo as recomendações do fabricante. As reações de ligação geraram fragmentos contendo as sequências montante e ajuante da

região codificadora de *ssa_0094*, ligadas ao gene *erm^r*, os quais foram amplificados com os pares de *primers* P1/E2 e E1/P2; os produtos destas reações foram monitorados em géis de agarose (Figura 1C). Estes fragmentos foram utilizados como *template* em reações de PCR realizadas com os *primers* 94P1 e 94P4, para gerar alelos mutados de 1761 pb, nos quais o gene *ssa_0094* foi substituído pelo gene *erm^r*. As reações de PCR foram realizadas com enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade com atividade *proof Reading* (Taq DNA Polymerase High Fidelity, Life Technologies, USA). Para gerar o alelo mutado, a reação de PCR foi composta por: 79 µL de H₂O ultrapura, 9 µL de Tampão PCR 10X, 2,3 µL de solução de dNTPs a 10 µM, 2,0 µL de solução de cada *primer* a 10 µM, 1,8 µL de Taq DNA Polimerase HF e 1 µL de DNA molde (0,5 µL de P1/E2 purificado e 0,5 µL de E1/P4 purificado). As condições de ciclagem incluíram extensão inicial 95°C (5 min.), seguida de 30 ciclos a 95°C (45 seg.), 58°C (30 seg.), 68°C (120 seg.), 68°C (10 min.). Os amplicons de tamanho esperado (1.761 pb) foram então purificados do gel de agarose a 0,8% (Figura 2), utilizando-se o *kit PCR Purification QIAEX II Gel Extraction* (QIAGEN, EUA).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na estratégia de inativação do gene *ssa_0094* através de mutagenese por PCR e ligação.

<i>Primers</i>	Sequencia 5'-3' (Forward//Reverse) ^a	Tamanho (pb)/ T ^o m
ermE1-ascl	TTGGCGCGCCTGGCGGAAACGTAAAAGAAG	1000pb/ 59°C
ermE2-xhoI	TTCTCGAGGGCTCCTTGAAGCTGTCAGT	
SSA_0094 P1	AAAATAGACGAAGAAGAAGCGACAG	22pb/ 59.13°C
SSA_0094-Ascl P2	TTGGCGCGCCACAAAGGCAATGCTGACAAA	30pb/ 59.32°C
SSA_0094-XhoI P3	TTCTCGAGAACTGAAAACCATACGACCAC	30pb/ 58.03°C
SSA_0094 P4	ATCAAACCTGCTGTCGTAGGC	21pb/ 59.40°C

^aAs sequências sublinhadas correspondem aos sítios de restrição inseridos em cada *primer*. T^om; temperatura de anelamento do *primer*.

Para a construção do mutante SK0094, o total de 10 µL dos fragmentos recombinantes purificados (Figura 2) foi utilizado para a transformação natural da cepa SK36. Os transformantes foram recuperados em culturas em BHI ágar contendo 10 µg/mL de eritromicina. A substituição do locus de *ssa_0094* pelo alelo mutado em 11 dos transformantes isolados foi confirmada através de PCR de colônia com os pares de *primers* P1/P4 (Figura 3). Os mutantes foram cultivados em BHI acrescido de 10 µg/mL de eritromicina e estocados a -

20°C em *skim milk* (Difco Labs). O DNA genômico de um dos transformantes confirmados por PCR foi purificado e submetido ao sequenciamento para confirmar a correta substituição *ssa_0094* pelo gene de resistência à eritromicina.

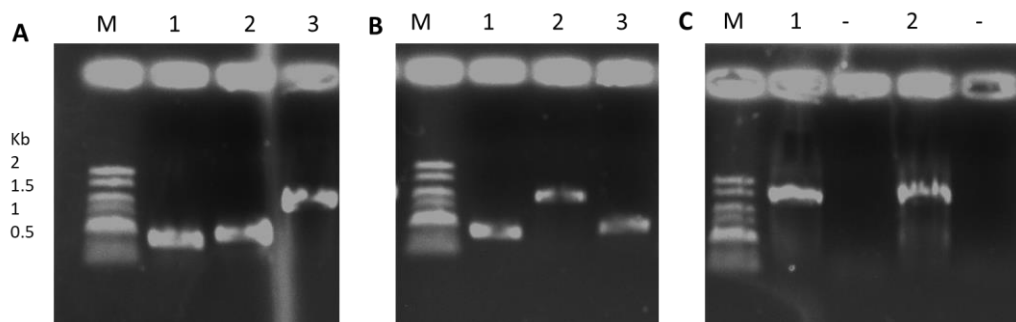


Figura 1 - Gel de Agarose (1,5%) contendo 10 µL de produtos de PCR utilizados para construção do mutante SK0094. A) Produtos de PCR purificados. Canaletas 1 e 2: produtos obtidos das regiões que flanqueiam *ssa_0094* com P1/P2 (361 pb) e P3/P4 (421 pb) respectivamente, a partir de DNA genômico da cepa selvagem. Canaleta 3: produtos obtidos com *primers* E1/E2 (Erm) a partir do plasmídeo pVA838 (979 pb). B) Produtos de PCR digeridos com enzimas *AscI* e/ou *XhoI*. Canaleta 1: produto P1/P2 (361 pb) digerido com *AscI*; canaleta 2: produto E1/E2 (979 pb) digerido com *AscI* e *XhoI*; canaleta 3: produto P3/P4 (421 pb) digerido com *XhoI*. C) Produtos das reações PCR obtidos com P1/E2 (1340 pb) (canaleta 1) e E1/P4 (1400 pb) (canaleta 2), nas quais utilizaram-se os produtos de ligação dos fragmentos a montante e a jusante de *ssa_0094* com o gene de resistência à eritromicina.

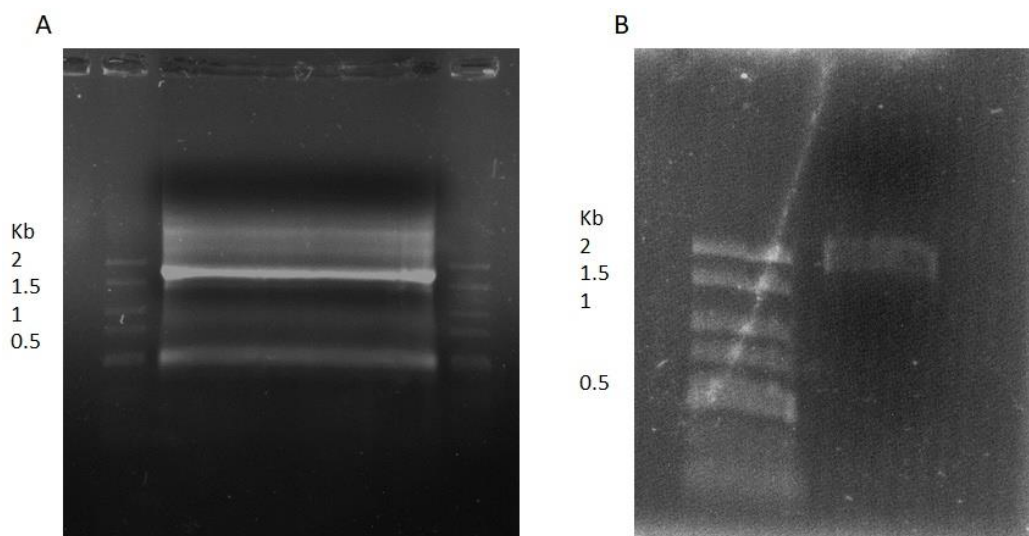


Figura 2 - Produto P1/E1+E2/P4 recombinante de *ssa_0094*. A) Gel de Agarose (0,8%) contendo 240 µL de produtos de PCR para purificação do produto do gel utilizado na construção do mutante SK0094. B) Produto P1/E1+E2/P4 de *ssa_0094* (1761 pb) purificado do gel utilizado para transformação da cepa selvagem SK36.

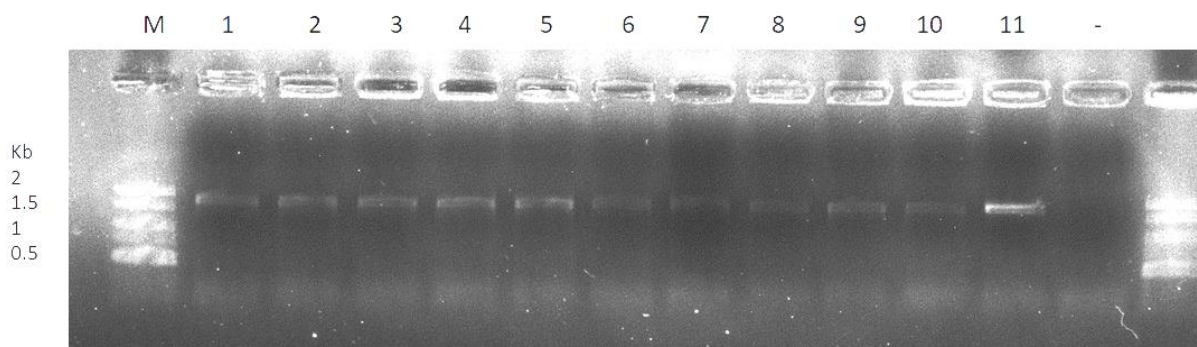


Figura 3 - Produtos de PCR obtidos com *primers* 94P1/94P4 de colônias de 11 transformantes de SK36 com o alelo defeitivo no gene *ssa_0094*. Produtos de tamanho esperado (1761 pb) foram obtidos de todos os transformantes. A última canaleta (-) corresponde ao produto das reações sem DNA (controle negativo).

4.3 Ensaios de complementação da cepa mutante SK0094

Para a construção de plasmídeo auto-replicativo contendo cópia intacta do gene *ssa_0094* (incluindo-se sua região promotora), o gene *ssa_0094* foi amplificado a partir do DNA genômico da cepa selvagem SK36, utilizando *primers* específicos C1/C2 (Figura 4). O fragmento amplificado foi então purificado (Figura 5) e digerido com as endonucleases *Bam*HI e *Sph*I e o produto de digestão purificado foi monitorado em gel de agarose (Figura 6). Este inserto foi então ligado ao plasmídeo auto-replicativo em estreptococos pDL278 (o qual contém gene de resistência à espectinomicina) e transformado em *E. coli*, para propagação. Um total de sete colônias de transformantes foram então cultivadas para propagação e purificação dos plasmídeos obtidos, para análises subsequentes da correta clonagem do inserto. Os plasmídeos obtidos destes sete clones foram utilizados em reações de PCR com *primers* para o gene da espectionimicina presente em pDL278. Os produtos obtidos destas reações confirmaram a presença dos plasmídeos pDL278 (Figura 7). A seguir, as mesmas amostras de DNA plasmidial foram aplicadas em reações de PCR com *primers* C1 e C2 para confirmação da presença do inserto.

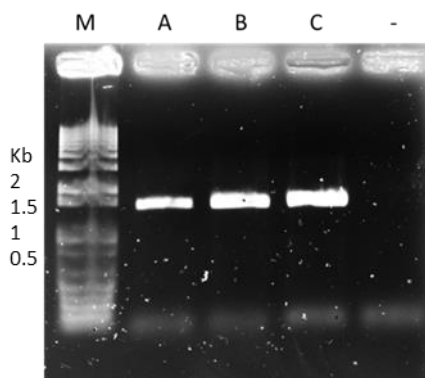


Figura 4 - Produtos de PCR obtidos com *primers* C1 e C2 a partir do DNA genômico da cepa parental SK36 (tamanho 1.535 pb). Diferentes temperaturas de anelamento foram testadas: A (52 °C), B (54 °C) e C (56 °C). Última canaleta representa o controle negativo da reação de PCR realizada sem DNA.

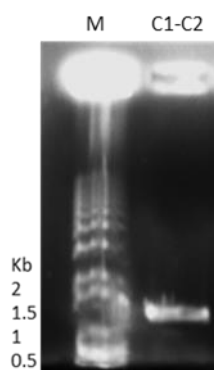


Figura 5 -: Gel de monitoramento da integridade do produto de PCR obtido com *primers* C1 e C2, após procedimento de purificação em coluna.

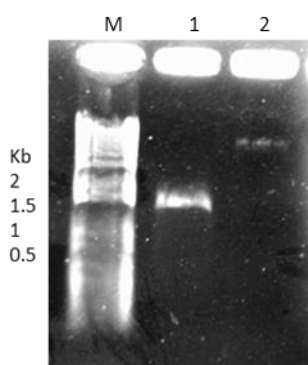


Figura 6- Gel de monitoramento do produto de PCR do gene *ssa_0094* (canaleta 1) e pDL278 (canaleta 2) após digestão com as enzimas *Bam*HI e *Sph*I e purificação por coluna utilizando-se *QIAquick PCR Purificacion Kit*.

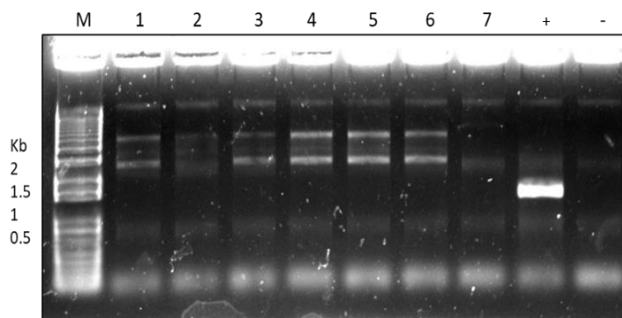


Figura 7 - Produtos de PCR obtidos com *primers* C1 e C2 com o DNA plasmidial propagado em sete clones de *E. coli* recuperados após transformação com pDL0094. Como controle positivo, foi realizada reação de PCR com DNA genômico da cepa SK36 (1.535 pb). A última canaleta representa o controle negativo sem DNA.

4.4 Construção de plasmídeo auto-replicativo para complementação da mutante SK0094

A complementação do mutante SK0094 foi iniciada com a construção de plasmídeo auto-replicativo pDL278, no qual o gene *ssa_0094* (incluindo sua região promotora) foi clonado. A obtenção deste inserto foi realizada através de PCR com *primers* C1 e C2 (Tabela 2), utilizando-se o DNA genômico de SK36. Os *primers* C1 e C2 contêm respectivamente, as sequências de restrição das endonucleases *Bam*HI e *Sph*I. Assim, os produtos de PCR obtidos foram avaliados em gel de agarose a 1%, purificados em colunas *QIAquick PCR Purification Kit* e digeridos com ambas as endonucleases. As reações de digestão consistiram de 2 µg de produto, 5 µL Buffer 2.1, 2 µL de enzima *Bam*HI, 4 µL de enzima *Sph*I e 29,95 µL de H₂O, sendo incubadas por 2h em temperatura de 37°C. Os produtos digeridos foram então purificados utilizando-se *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) e a integridade dos mesmos monitorada em gel de agarose a 1%. A digestão do plasmídeo pDL278 com as mesmas enzimas, também foi realizada em reações incubadas a 37°C por 2h e 10 minutos a 65°C, contendo 40 µg de DNA plasmidial, 5 µL Buffer 2.1, 2 µL de enzima *Bam*HI, 4 µL de enzima *Sph*I e 35,94 µL de H₂O. O plasmídeo digerido foi então purificado em coluna. A ligação do segmento gênico ao plasmídeo (ambos digeridos e purificados) foi realizada em volumes de 30 µL contendo 1 µL de enzima T4 DNA ligase, e 0,6 µL de DNA do inserto e plasmídeo (na proporção 1:1 de 1:3 de plasmídeo para inserto). Após a incubação a 25°C durante 1h e 65°C por 10 minutos, as reações foram transformadas em *E. Coli* e os transformantes recuperados do ágar LB acrescido de 100 µL de espectinomicina e utilizados para propagação de vetor, então designado pDL0094.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na construção de plasmídeo para a complementação do mutante SK0094.

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3' (<i>Forward</i> // <i>Reverse</i>) ^a	Tamanho (pb)/ temperatura de fusão
C1_ <i>Bam</i> HI	TTGGATCCTAGACGAAGAAGCGACAGC	19 pb/ 53.67°C
C2_ <i>Sph</i> I	TTGCATGCTATTCTTTTCGTCGCGTGT	19 pb/ 54.16°C

^aAs sequências sublinhadas correspondem aos sítios de restrição inseridos em cada *primer*. T^{°m}; temperatura de anelamento do *primer*.

4.5 Extração de RNA e conversão em cDNA para confirmação da complementação da cepa SK0094+ por RT-qPCR

Para confirmar a complementação do gene *ssa_0094* no mutante complementado (designado SK0094+), amostras de RNA da cepa selvagem SK36, do mutante SK0094 e do complementado SK0094+ foram purificadas e convertidas em cDNA para avaliar a expressão do gene *ssa_0094* por RT-qPCR utilizando *primers* internos específicos (Tabela 3). Para isso, as células foram coletadas a partir de culturas crescidas na metade da fase exponencial (A_{550nm} 0,3) sob atmosfera de 10% CO₂. Para extração do RNA total, as células coletadas foram lisadas na presença de aproximadamente 0,16 g de esferas de zircônia (0,1 mm de diâmetro) (Biospec, EUA) adicionadas de 200 µL de TE (Tris-HCL 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM e pH 8,0), com auxílio do aparelho Mini-Bead Beater (Biospec, EUA), sob força máxima (2 ciclos de 30s cada, com intervalos de 30s em gelo). A purificação do RNA total foi realizada utilizando-se o *RNeasy MiniKit* (QIAGEN, Alemanha), segundo instruções do fabricante. O RNA purificado foi tratado com 10 U de Turbo DNase (Invitrogen), para a eliminação completa do DNA genômico. A concentração e pureza das amostras foram então analisadas por espectrofotometria em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). A razão entre as leituras A_{260nm}/A_{280nm} foi superior a 1,8. A integridade das amostras de RNA também foi monitorada em géis de agarose a 1,2% de formaldeído contendo 0,15 g/mL de brometo de etídio (Figura 8).

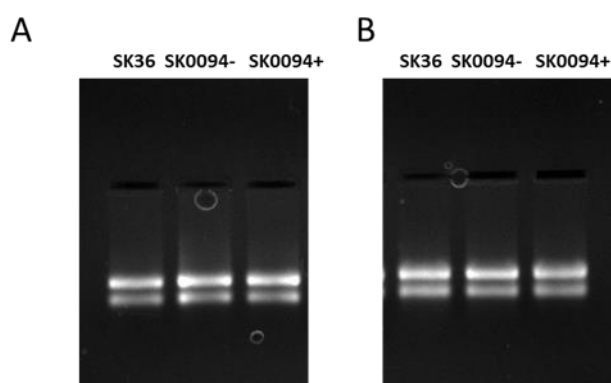


Figura 8 - Gel de agarose (1,2%) mostrando a integridade do RNA extraído (0,5 µg). (A) RNA antes e (B) depois do tratamento com DNase turbo. As cepas de *S. sanguinis* SK36 (parental), SK0094 (mutante isogênico) e SK0094+ (mutante complementado) foram crescidas em meio BHI (10% CO₂, 37°C) até a A_{550nm} 0,3, e as células coletadas por centrifugação (5 min, 5.000 x g, 4°C) para a extração de RNA.

Tabela 3 - *Primers* utilizados na análise de expressão por RT-qPCR.

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3' (Forward//Reverse)	Tamanho (pb)/ temperatura de fusão
SSA_0094_RT-qPCR_F	TGAGCCAACAACCTTACAATGC	155 pb/ 56°C
SSA_0094_RT-qPCR_R	CTGGGCGGTAGAGACTAAATTC	

Para obtenção de cDNA, foram realizadas reações de transcrição reversa (RT), utilizando-se o sistema *SuperScript III* (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante. Para isto, foram realizadas misturas contendo 1 µg de RNA total livre de DNA, 3 µL da mistura dos *primers* arbitrários (Moraes *et al.*, 2014) na concentração final de 30 µM para cada oligo, 2 µL de 10 mM DNTP mix e H₂O DEPC qsp 26 µL. As reações de RT ocorreram em termociclador (*Thermoblock T1*, Biometra, Alemanha). Inicialmente as amostras foram aquecidas a 65° (5 min) e resfriadas a 4°C (1 min). Em seguida, a reação no termociclador foi pausada para pipetagem de 14 µL do Mix contendo 8 µL Buffer 5X; 2 µL de 0,1M DTT; 2 µL de RNase OUT (40 U/ µL) e 2 µL de *SuperScript III* (200 U/ µL). A seguir, as reações prosseguiram através da ciclagem a 25°C (10 min), 50°C (3 h) e 85°C (5 min). Os cDNAs

obtidos foram estocados a -20°C, até o momento do uso. Como controles da contaminação por DNA genômico, foram utilizadas amostras de RNA tratadas sob as mesmas condições, substituindo-se 2 µL de *SuperScript III* (200 U/ µL) por 2 µL de H₂O DEPC.

As reações de PCRq ocorrerão em amostras contendo os cDNAs (30 ng), 30 µM de cada par de *primer* e mistura *SYBR-Green PCR 1x* (*Applied Biosystems*) em volume total de 10 µL e foram submetidas à ciclagem térmica em sistema de PCR quantitativo *Step One* (*Applied Biosystems*). O ciclo térmico de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95°C (10 min), seguida de 45 ciclagens de desnaturação a 94°C (15 s), anelamento a ≈58°C (15 s) e extensão a 72°C (30 s). Os ensaios foram realizados em duplicata, a partir de amostras cDNA obtidas em três experimentos independentes. Amostras sem cDNA e sem transcriptase reversa foram incluídas para assegurar a ausência de DNA contaminante. Para cada ensaio, curvas de amplificação de DNA em quantidades crescentes (0; 0,03; 0,3; 3; 30 e 300 ng/poço) foram realizadas. O gene *16SRNAr* foi utilizado como gene referência, o qual se mostrou invariável entre as cepas.

4.6 Confirmação da complementação da cepa complementada SK0094+ por RT-qPC

A restauração da expressão do gene *ssa_0094* na cepa complementada SK0094+ foi confirmada por análise de RT-qPCR. Como mostrado na Figura 9, foi observada amplificação do gene *ssa_0094* (*primers* internos; 155 pb) para o cDNA proveniente da cepa complementa SK0094+. Por outro lado, o mutante SK0094 (defectivo no gene *ssa_0094*) mostrou amplificação abaixo do ponto negativo da curva padrão (sem DNA). Quando comparado à curva de amplificação da cepa parental SK36, o mutante complementado SK009+ restaurou em aproximadamente 50% os níveis de transcritos de *ssa_0094*, o que confirma a inserção e complementação do gene *ssa_094*. Devido ao pDL278 ser um plasmídeo auto-replicativo, o número de cópias do gene *ssa_0094* (inserido no pDL278) pode variar dependendo da fase e condições de crescimento. As amostras de cDNA testadas inicialmente foram obtidas de células na metade da fase exponencial de crescimento (A_{550nm} 0,3) e sob 10% de CO₂, o que poderia explicar a complementação parcial dos transcritos de *ssa_0094*.

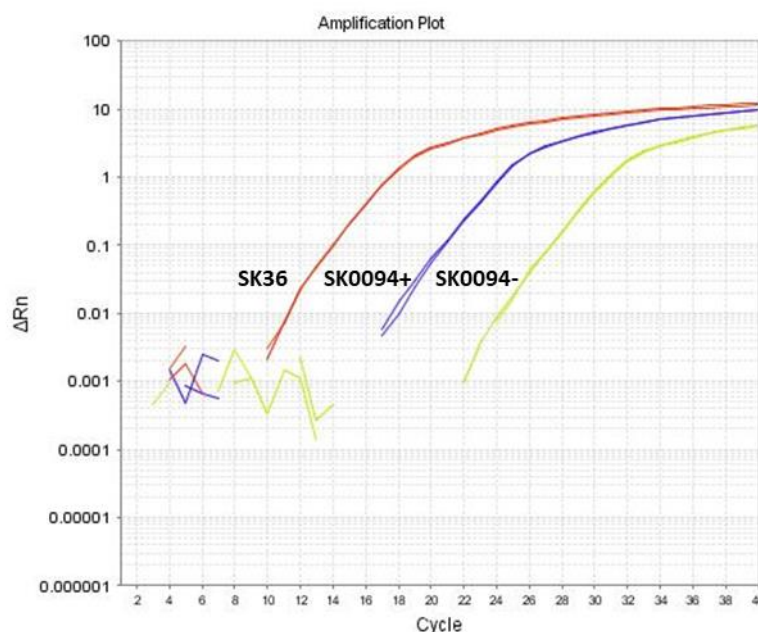


Figura 9 - Curva de amplificação do gene *ssa_0094* por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Amostras de cDNA (1 μ L) das cepas SK36 (vermelho), do mutante SK0094 (verde) e da cepa complementada SK0094+ (roxo) foram adicionadas a 9 μ L da mistura (SYBR green, Primers e H₂O) e quantificados por RT-qPCR. As curvas representam o número de ciclos necessários (eixo horizontal) para amplificação e detecção por fluorescência (eixo vertical) do gene *ssa_0094*.

4.7 Quantificação de DNA extracelular em sobrenadantes de cultura entre as cepas *S. sanguinis* parental SK36 e as mutantes isogênica e complementada de *ssa_0094*

As quantidades de DNA extracelular produzidas pelas cepas estudadas foram comparadas através de ensaios de PCR quantitativo (PCRq) em culturas planctônicas. Para isto, culturas em BHI das cepas estudadas com as absorbâncias ajustadas (A_{550nm} 0,3) foram diluídas em garrafas de 50 mL em meio BHI contendo 25 μ L de eritromicina para o mutante SK0094 e 100 μ L de espectinomicina para a cepa complementada SK0094+. As amostras foram incubadas (aerobiose, 37°C). Os sobrenadantes de volumes de 1 mL das culturas das cepas estudadas ao final da fase log de crescimento (A_{550nm} 0,7) foram coletados por centrifugação (16.000 x g, 4°C, 10 min). Os sobrenadantes foram então filtrados através de membranas de polietersulfona com poros de 0,22 μ m de diâmetro (Kasvi, K18-230; baixa afinidade a DNA), para remoção de células remanescentes. Ensaios de PCRq foram então realizados utilizando-se sistema *StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies)* com volumes de 1 μ L de sobrenadante filtrado acrescido de 3,4 μ L de água ultrapura, 5 μ L de *Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, USA)* e 0,3 μ L de solução de *primers*

(10 μ M) específicos para o gene *16SrRNA* (5'- CGTAAACGATGAGTGCTAGGTG-3' e 5'- TAGAGCGGTCAGAGGATGT-3'). As condições térmicas das reações de amplificação incluíram aquecimento a 95°C (10 min), seguido de 40 ciclos de 95°C (por 15 s), 58°C (por 15 s) e 72°C (por 30 s). As concentrações de DNA foram calculadas com base ciclo limiar médio (cycle threshold) obtido para amostras de DNA genômico purificado de SK36 diluídas (1:10) em série. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.8 Comparação das curvas de crescimento entre as cepas parental e SK0094

As curvas de crescimento das cepas SK36, SK0094 e SK0094+ foram determinadas em meio BHI (acrescidos de eritromicina para SK0094, eritromicina e espectinomicina para SK0094+). As cepas foram inoculadas em BHI ágar (acrescido ou não de eritromicina e espectinomicina) e incubadas (37°C; 10% de CO₂) por 24 a 30h. em seguida, colônias foram transferidas para caldo de BHI suplementado com eritromicina e para SK0094+ foi suplementado com eritromicina e espectinomicina e então incubadas (37°C, 10% de CO₂) por 18h. As culturas de 18h de cada cepa tiveram as absorbâncias ajustadas (A_{550nm} 0,035) em 50 mL de meio fresco (frascos de 250 mL) e incubadas em aerobiose sob agitação (160 rpm). Alíquotas das culturas foram então coletadas a cada 1 h durante 8 horas, para a determinação das absorbâncias (A_{550nm}). Foram obtidas também curvas de crescimento em condições semelhantes, mas sob atmosfera de 10% de CO₂. Três ensaios independentes foram realizados em triplicata.

4.9 Análise da formação de biofilmes *in vitro* em placas de poliestireno

Culturas em BHI das cepas estudadas com absorbâncias ajustadas (A_{550nm} 0,3) foram diluídas (1:10) em meio BHI e BHIS com 1% sacarose, e alíquotas destas diluições (200 μ L) foram então transferidas para cada poço de placas de poliestireno tratadas ou não com saliva, em quadruplicata. As placas foram então incubadas (37°C) sob moderada agitação (80 rpm) durante 18h. Após isto, alíquotas dos fluídos dos biofilmes foram transferidos para novas microplacas, para monitoramento do crescimento planctônico (A_{550nm}) e o restante das células aderidas foram fixadas por prévia incubação a 60°C por 30 min. Os biofilmes foram então lavados cuidadosamente com água através de três submersões, para remoção das células fracamente aderidas. A seguir, estes foram então corados com violeta cristal a 1% durante 30 min em temperatura ambiente. As placas foram então submetidas a nova série de lavagens e o corante dos biofilmes foi eluído em etanol durante incubação em temperatura ambiente por

30 min. As absorvâncias (A_{575nm}) das eluições foram determinadas em novas placas e expressas como medidas indiretas da biomassa dos biofilmes.

5 RESULTADOS

5.1 Análise das curvas de crescimento das cepas SK36, SK0094 e SK0094+ em meio BHI sob atmosfera de aerobiose e 10% de CO₂

As curvas de crescimento de SK36, SK0094 e SK0094+ foram determinadas em meio BHI (acrescido de eritromicina para SK0094 e espectinomicina para SK0094+), nas atmosferas de aerobiose e 10% de CO₂. Como mostrado na Figura 10, o mutante SK0094 demonstrou crescimento um pouco mais lento, comparando à SK36 sob atmosfera de aerobiose, o qual não foi completamente restaurado na cepa SK0094+, possivelmente por influência dos antibióticos utilizados para crescimento desta cepa. Todas as cepas tiveram crescimento maior em atmosfera de 10% de CO₂ (90% ar), comparado ao crescimento em aerobiose, sob agitação. Entretanto, novamente as cepas SK0094 e SK0094+ tiveram crescimento moderadamente mais lento do que da cepa SK36, a qual foi cultivada na ausência de antibióticos.

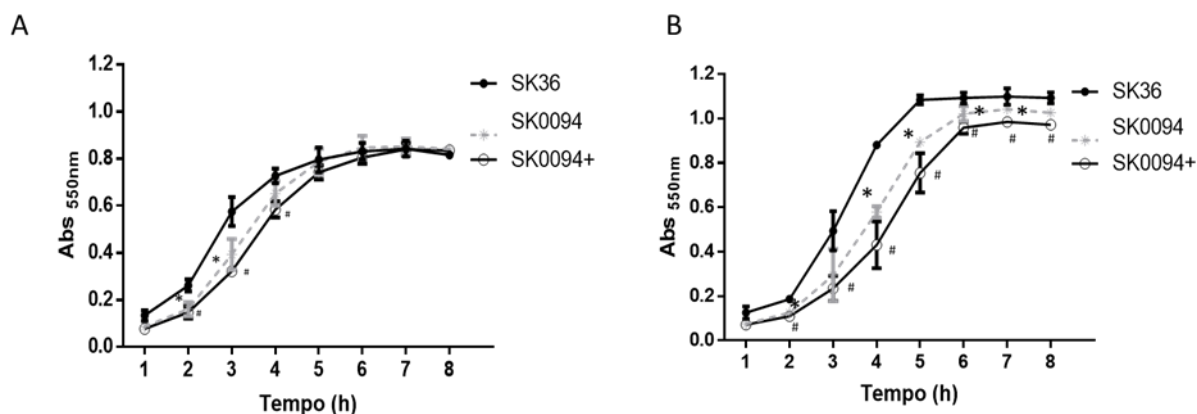


Figura 10 - Curvas de crescimento em BHI das cepas *S. sanguinis* SK36, da mutante SK0094 e mutante complementado SK0094+, sob atmosferas de (A) aerobiose e (B) 10% CO₂. Símbolos indicam diferença estatisticamente significativa do mutante SK0094 (*) e do complementado SK0094+ (#) em relação à cepa selvagem SK36 (Mann-Whitney; $p < 0,05$). Os símbolos representam médias de duplicata de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão.

5.2 Análise de microscopia de luz da morfologia e arranjo celular das cepas SK36, SK0094 e SK0094+

Análises de microscopia de luz das cepas estudadas em duas fases de crescimento, metade da fase log (A_{550nm} 0,3) e final da fase log (A_{550nm} 0,7), não revelaram alterações significativas no arranjo celular entre as cepas, quando cultivadas sob aerobiose (Figura 11) ou 10% de CO_2 (Figura 12). Entretanto, sob aerobiose, a mutante SK0094 tendeu a apresentar cadeias um pouco menores do que as da cepa parental SK36 e de SK0094+ (Figura 11A). Estes fenótipos foram ainda observados nas culturas obtidas em 10% de CO_2 em ambas as fases de crescimento testadas (Figura 12).

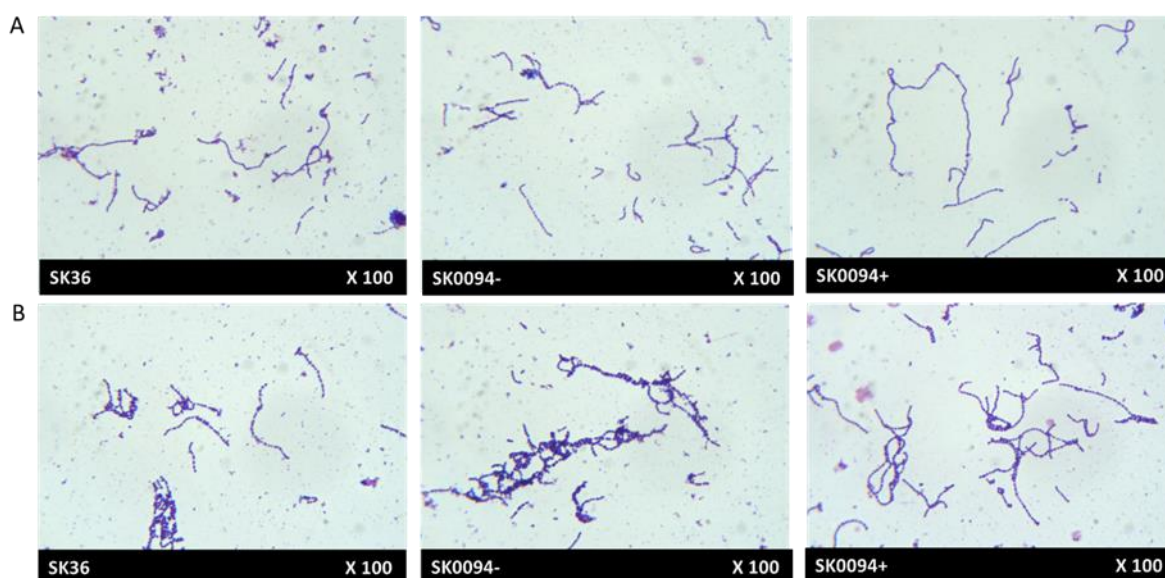


Figura 11 - Análise de microscopia de luz das cepas de *S. sanguinis* SK36, SK0094 e SK0094+. As cepas foram crescidas sob atmosfera de aerobiose em BHI. Aliquotas de 10 μ L das culturas na A_{550nm} 0,3 (A) e A_{550nm} 0,7 (B), foram fixadas e corados pelo método de Gram para observação em microscópio óptico, sob aumento de 100x. As imagens foram obtidas com auxílio de câmera fotográfica digital (XCAM 5.0 MP) integrada ao microscópio óptico (Nova Optical Systems). Cada imagem é representativa de três culturas independentes.

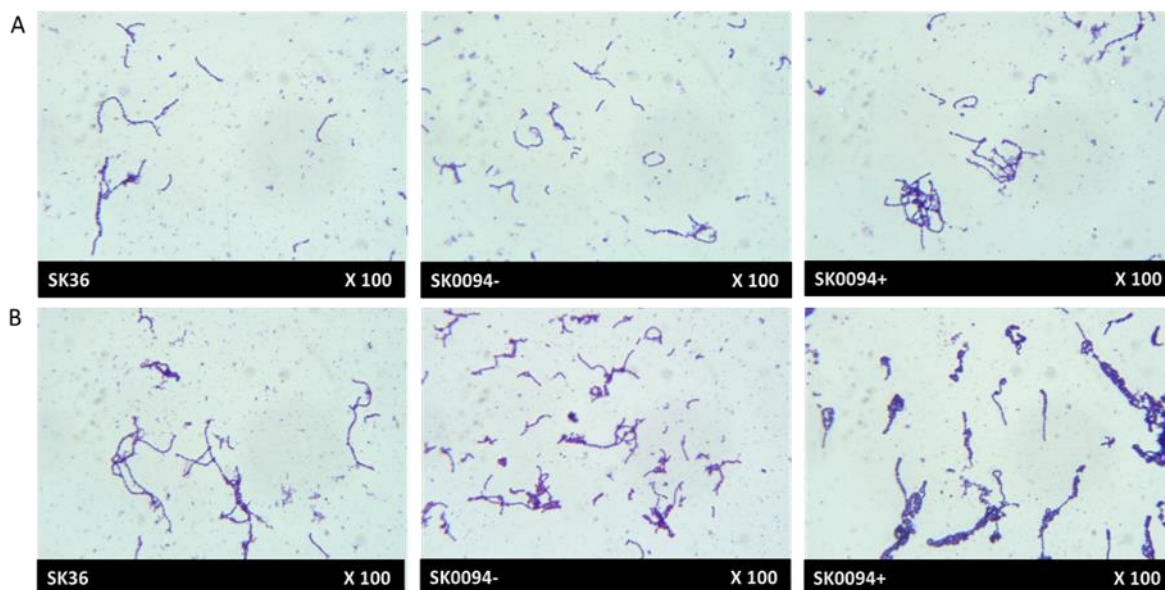


Figura 12 - Análise de microscopia de luz das cepas de *S. sanguinis* SK36, SK0094 e SK0094+. As cepas foram crescidas sob atmosfera de 10% CO₂ e analisadas na A_{550nm} 0,3 (A) e A_{550nm} 0,7 (B). Aliquotas de 10 μ L foram fixadas e coradas pelo método de Gram para observação em microscópio óptico, sob aumento de 100x. As imagens foram então obtidas com auxílio de câmera fotográfica digital (XCAM 5.0 MP) integrada a microscópio óptico (Nova Optical Systems). Cada imagem é representativa de três culturas independentes.

5.3 A inativação de *ssa_0094* promove maior liberação de DNAe em culturas planctônicas nas fases exponencial e estacionária de crescimento

As cepas de *S. sanguinis* foram comparadas quanto à produção de DNA extracelular (DNAe) em culturas planctônicas das cepas SK36, SK0094 e SK0094+ nas fases exponencial (A_{550nm} 0,3) e estacionária (A_{550nm} 0,7). Como mostrado na Figura 13A, foram detectados aumentos significativos na produção de DNAe no mutante SK0094 ($P < 0.05$) na fase exponencial (A_{550nm} 0,3) comparado à cepa SK36. As concentrações de DNAe nas cepas SK36 e SK0094 foram de 328,37 e 519,23 ng/ μ L, respectivamente. Já na fase estacionária de crescimento (A_{550nm} 0,7), a produção de DNAe foi 158,12% maior no mutante SK0094, comparado à cepa parental ($P < 0.05$). Na fase estacionária (Figura 13B), onde ocorre a maior liberação e produção de DNAe, a cepa complementada SK0094+ restaurou os níveis de produção de DNAe, quando comparado a cepa selvagem SK36 ($p > 0.05$). O mutante SK0094 apresentou (1,58 e 1,96 vezes, respectivamente) mais liberação de DNAe nas fases exponencial e estacionária de crescimento, quando comparado à cepa SK36.

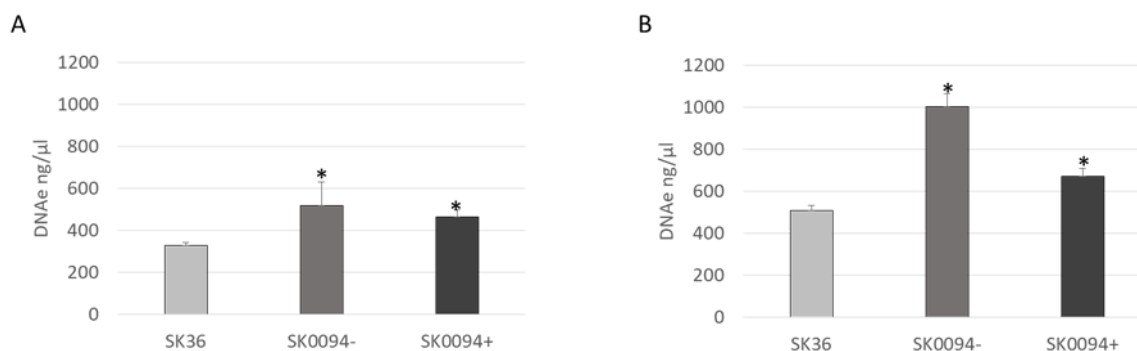


Figura 13 - Quantificação de DNA extracelular (DNAe) das cepas de *S. sanguinis* SK36, mutante SK0094 e da cepa mutante complementada SK0094+ em aerobiose. Análises de RT-qPCR foram realizadas em cepas crescidas em BHI nas absorvâncias de A_{550nm} 0,3 (A) e A_{550nm} 0,7 (B). As colunas indicam médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras indicam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com a cepa selvagem SK36 (Kruskal Wallis, * p< 0,05).

5.4 A inativação do gene *ssa_0094* diminui significativamente a formação de biofilmes em *S. sanguinis*

O mutante isogênico SK0094 e a cepa complementada SK0094+ foram comparados à cepa parental SK36 quanto à formação de biofilme *in vitro* em meio BHI ou BHI suplementado com saliva humana a 10% (BHIS). Como mostrado na Figura 14A, a biomassa dos biofilmes formados por SK0094 em BHI sob aerobiose foi 40,93% menor (p<0,05) do que a de biofilmes formados pela cepa parental SK36. A biomassa dos biofilmes formados pela cepa complementada SK0094+ em BHI em aerobiose foi semelhante à biomassa formada pela cepa parental SK36 (p>0,05) (Figura 14A). Em meio BHIS não houve diferenças significativas na biomassa de biofilmes entre as cepas testadas (Figura 14A). Como mostrado na Figura 14B, sob atmosfera de 10% de CO₂, a cepa mutante SK0094 também demonstrou redução na capacidade de formar biofilmes em meio BHI, os quais tiveram biomassa 38,7% menor que a de biofilmes formados pela cepa parenteral SK36 (p<0,05). Este fenótipo foi ainda restaurado na cepa complementada SK0094+, a qual formou biofilmes de biomassa semelhante da cepa parental SK36. Sob esta atmosfera, as diferenças na biomassa de biofilmes entre o mutante SK0094 e as cepas SK36 e SK0094+ foram menores (embora estatisticamente significantes; p<0,05) em meio BHIS comparado ao meio BHI. Portanto, a inativação de *ssa_0094* teve efeito significativo na formação de biofilmes *in vitro* na ausência de fatores salivares, possivelmente porque este gene está envolvido em mecanismos de formação de biofilmes independentes da presença de saliva.

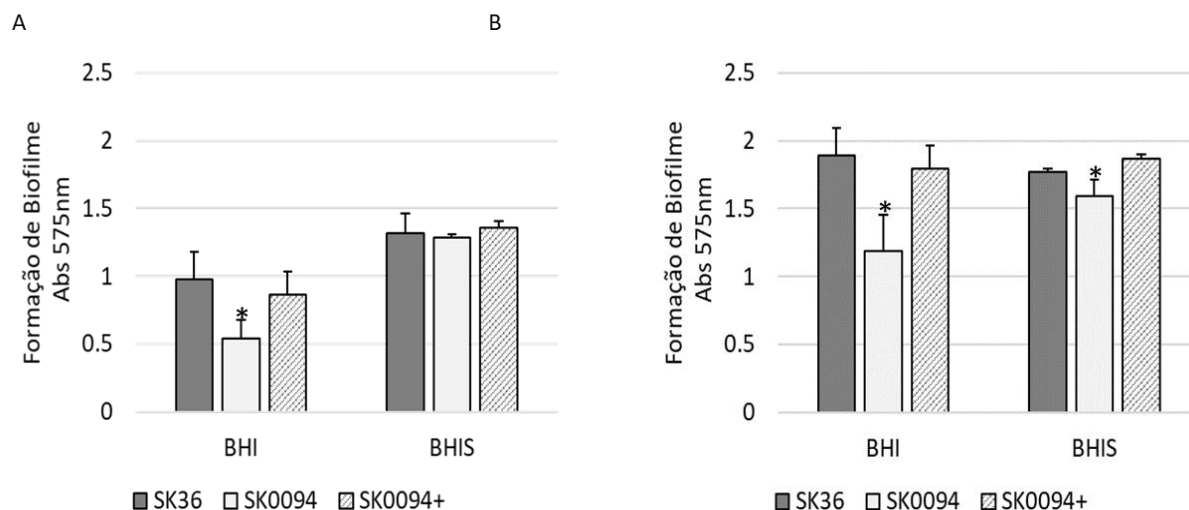


Figura 14 - Biofilmes de 18h formados em placas de microtitulação pelas cepas de *S. sanguinis* SK36, mutante SK0094 e mutante complementada SK0094+ em meios de cultura BHI e BHIS (BHI suplementado com 10% de saliva humana). As placas foram incubadas com as culturas na presença de meio de cultivo BHI com 1% de sacarose e condições atmosféricas de aerobiose (A) e 10% CO₂ (B). As colunas representam a média de três experimentos independentes. As barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação à cepa selvagem SK36 (Kruskal Wallis, * $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O gene *ssa_0094* é parte do regulon do SDC VicRK, que controla diretamente diversos genes envolvidos na formação de biofilmes, crescimento e homeostase de parede celular de peptidoglicano (Moraes et al., 2014). Este trabalho mostrou a primeira caracterização funcional do gene *ssa_0094* em *Streptococcus sanguinis*. Através das análises do crescimento planctônico das cepas em estudo sob diferentes condições atmosféricas, foi possível observar nas condições atmosféricas de aerobiose (sob agitação), que a mutante SK0094 apresentou crescimento mais lento quando comparado à cepa SK36, assim como a cepa complementada SK0094+, que também apresentou menor crescimento, ou seja, esta não teve o fenótipo completamente restaurado possivelmente por influência dos antibióticos utilizados na cultura da cepa complementada SK0094+. As cepas em estudo cresceram melhor em atmosfera de 10% de CO₂ em comparação com o crescimento em atmosfera de aerobiose sob agitação. No entanto, as cepas mutantes SK0094 e complementada SK0094+ apresentaram crescimento mais lento comparado à cepa SK36, devido à presença de antibióticos utilizados para cultura das cepas mutante e complementada. A partir dos ensaios para avaliar o crescimento bacteriano, foram realizadas lâminas para avaliar a morfologia e arranjo das células bacterianas. Na metade da fase log (A_{550nm} 0,3) e no final da fase log (A_{550nm} 0,7) do crescimento bacteriano em atmosfera de 10% de CO₂, foi possível observar através de microscopia de luz que não houve alteração morfológica significativa no arranjo das células das cepas em estudo. Por outro lado, em atmosfera de aerobiose, a cepa mutante SK0094 apresentou cadeias menores em relação às cadeias das cepas SK36 e SK0094+. Estes dados sugerem que *ssa_0094* seja mais ativa sob condições de crescimento aeróbico.

S. sanguinis é um colonizador comensal pioneiro dos dentes (Moraes et al., 2014). Assim, coloniza os dentes quando há maior disponibilidade de oxigênio, condição propícia para a produção de DNA extracelular (Kreth et al., 2017), um importante componente da matriz extracelular de biofilmes de *S. sanguinis* em formação. Com o objetivo de avaliar a formação de biofilme em *S. sanguinis*, foram realizadas análises comparativas das biomassas de biofilmes formados *in vitro*, as quais mostraram que a formação de biofilme por SK0094 em meio BHI sob aerobiose foi menor do que a formação de biofilmes pela cepa parental SK36, enquanto que a biomassa de biofilmes formados pela cepa complementada SK0094+ em meio BHI em aerobiose, apresentou-se semelhante à biomassa formada pela cepa parental. Sob condições aeróbicas, *S. sanguinis* produz H₂O₂, o qual pode induzir a liberação de DNAe (Kreth et al., 2009; Cullin et al., 2017). Além disso, a produção de H₂O₂ é maior em ambientes aeróbicos na presença de CO₂, assim como a função de hidrolases de mureína parece ser afetada pela presença de CO₂ (Camargo et al., 2018). Reduções significativas na formação

de biofilmes foram observadas em na cepa mutante SK0094 em comparação com a cepa parental, quando os biofilmes foram formados na presença de CO₂, sendo que as reduções de biomassa foram mais claramente verificadas em meio BHI não suplementado com saliva humana. Mas importante as reduções na formação dos biofilmes foram eliminadas quando o gene *ssa_0094* foi re-introduzido na cepa mutante. Sendo assim, estes ensaios revelaram que a inativação do gene *ssa_0094* afeta significativamente a formação de biofilmes por *S. sanguinis*.

Para melhor compreender a função de *ssa_0094* na formação de biofilme por *Streptococcus sanguinis*, foram feitos estudos da quantificação de DNA extracelular das cepas estudadas durante as fases exponencial (A_{550nm} 0,3) e estacionária de crescimento (A_{550nm} 0,7). As análises de quantificação de DNAe mostraram que a cepa mutante SK0094 tem maior crescimento na fase exponencial quando comparada à SK36, enquanto que na fase estacionária de crescimento a produção de DNAe pela cepa mutante SK0094 foi 158,12% maior que a produção de DNAe pela cepa parental SK36. Na fase estacionária, onde esperamos que ocorra a maior produção de DNAe, houve a restauração dos níveis de produção de DNAe pela cepa complementada SK0094+ comparada à cepa parental SK36.

O gene *ssa_0094* codifica uma proteína hipotética com função ainda desconhecida, contendo um domínio LysM, típico de proteínas que interagem e/ou clivam o peptidoglicano, sendo que a liberação de DNA extracelular pode ser uma das muitas consequências das funções da hidrolase de mureína, enzima que atua na hidrólise da parede celular bacteriana (Cullin et al., 2017). Esperávamos que a inativação do gene *ssa_0094* promovesse a diminuição da produção de DNAe, o que explicaria a redução na formação de biofilmes por 18h. No entanto os resultados obtidos mostram aumentos significativos na liberação de DNAe pela cepa mutante SK0094, sugerindo que a inativação de *ssa_0094* afeta a homeostase da parede celular de *S. sanguinis*, possibilitando a perda de DNA para o meio externo. Além disso, estudos em *S. sanguinis* (Moraes et al., 2014) demonstram que o eDNA desempenha papel mais relevante nos estágios iniciais de formação de biofilmes, enquanto que outros exopolímeros de açúcar (glucanos ou outros polissacarídeos) ou protéicos (fibras amilóides) possivelmente sejam componentes estruturais dominantes em biofilmes maduros. Assim, como nossas análises de formação de biofilmes foram realizadas por períodos mais longos de incubação (18h), é possível que estes ensaios não tenham permitido a detecção do efeito da produção de DNA na mutante SK0094 nos processos iniciais de formação de biofilmes. Estudos futuros dos estágios iniciais de formação de biofilmes com as cepas incluídas neste estudo poderão elucidar este ponto.

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que:

1. A inativação do gene *ssa_0094* promove maior produção de DNA extracelular em *S. sanguinis*.
2. A inativação do gene *ssa_0094* diminuiu a formação de biofilmes *in vitro*, principalmente na presença de CO₂ e ausência de fatores salivares.

REFERÊNCIAS^{1*}

- Camargo TM, Stipp RN, Alves LA, Harth-Chu EN, Höfling JF, Mattos-Graner RO. Novel Two-Component System of *Streptococcus sanguinis* Affecting Functions Associated with Viability in Saliva and Biofilm Formation. *Infect Immun*. 2018 Mar 22;86(4):e00942-17. doi: 10.1128/IAI.00942-17.
- Capra EJ, Laub MT. Evolution of two-component signal transduction systems. *Ann Rev Microbiol*. 2012;66:325-47. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150039.
- Cullin N, Redanz S, Lampi KJ, Merritt J, Kreth J. Murein Hydrolase LytF of *Streptococcus sanguinis* and the Ecological Consequences of Competence Development. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Dec 1;83(24):e01709-17. doi: 10.1128/AEM.01709-17.
- Di Filippo S, Delahaye F, Semiond B, Celard M, Henaine R, Ninet J, et al. Current patterns of infective endocarditis in congenital heart disease. *Heart*. 2006 Oct;92(10):1490-5. doi: 10.1136/hrt.2005.085332.
- Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol*. 1993 Sep;39(3):179-82. doi: 10.1099/00222615-39-3-179.
- Dubrac S, Bisicchia P, Devine KM, Msadek T. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol Microbiol*. 2008 Dec;70(6):1307-22. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06483.
- Ge X, Kitten T, Chen Z, Lee SP, Munro CL, Xu P. Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. *Infect Immun*. 2008 Jun;76(6):2551-9. doi: 10.1128/IAI.00338-08.
- Giacaman RA, Torres S, Gómez Y, Muñoz-Sandoval C, Kreth J. Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization and ex vivo hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults. *Arch Oral Biol*. 2015 Jan;60(1):154-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.09.007.
- Hamada S, Torii M, Tsuchitani Y, Kotani S. Isolation and immunobiological classification of *Streptococcus sanguis* from human tooth surfaces. *J Clin Microbiol*. 1980 Aug;12(2):243-9. doi: 10.1128/JCM.12.2.243-249.1980.

^{1*} 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.

Kreth J, Giacaman RA, Raghavan R, Merritt J. The road less traveled - defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. Mol Oral Microbiol. 2017 Jun;32(3):181-96. doi: 10.1111/omi.12170.

Kreth J, Vu H, Zhang Y, Herzberg MC. Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. J Bacteriol. 2009 Oct;191(20):6281-91. doi: 10.1128/JB.00906-09.

Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, et al. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. PLoS One. 2013 Jul 3;8(7):e67919. doi: 10.1371/journal.pone.0067919.

Mattos-Graner RO, Duncan MJ. Two-component signal transduction systems in oral bacteria. J Oral Microbiol. 2017 Nov 27;9(1):1400858. doi: 10.1080/20002297.2017.1400858.

Moraes JJ, Stipp RN, Harth-Chu EN, Camargo TM, Höfling JF, Mattos-Graner RO. Two-component system VicRK regulates functions associated with establishment of *Streptococcus sanguinis* in biofilms. Infect Immun. 2014 Dec;82(12):4941-51. doi: 10.1128/IAI.01850-14.

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev. 2009 Sep;73(3):407-50, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00014-09.

Shelburne SA 3rd, Granville C, Tokuyama M, Sitkiewicz I, Patel P, Musser JM. Growth characteristics of and virulence factor production by group A Streptococcus during cultivation in human saliva. Infect Immun. 2005 Aug;73(8):4723-31. doi: 10.1128/IAI.73.8.4723-4731.2005.

Von Reyn CF, Levy BS, Arbeit RD, Friedland G, Crumpacker CS. Infective endocarditis: an analysis based on strict case definitions. Ann Intern Med. 1981 Apr;94(4 pt 1):505-18. doi: 10.7326/0003-4819-94-4-505.

Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki LS, et al. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. J Bacteriol. 2007 Apr;189(8):3166-75. doi: 10.1128/JB.01808-06.

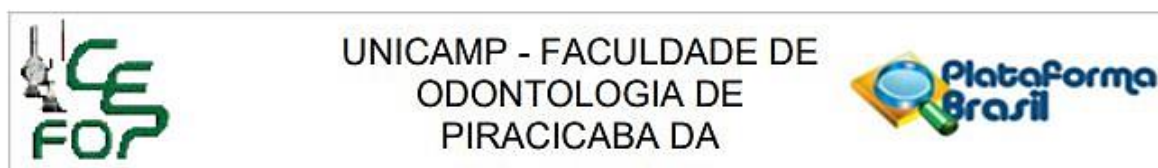
Yoshida Y, Konno H, Nagano K, Abiko Y, Nakamura Y, Tanaka Y, et al. The influence of a glucosyltransferase, encoded by gtfP, on biofilm formation by *Streptococcus sanguinis* in a dual-species model. APMIS. 2014 Oct;122(10):951-60. doi: 10.1111/apm.12238.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio



Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13190819.9.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.365.892

Apresentação do Projeto:

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

A LISTA DE PESQUISADORES CITADA na capa do projeto de pesquisa inclui Victor Aragão Abreu de Freitas (Cirurgião-Dentista, Doutorando no PPG em Biologia Bucodental, Área de Microbiologia e Imunologia, da FOP/UNICAMP, Pesquisador responsável), Johnny Naoki Soares (Graduando no curso de Odontologia da FOP/UNICAMP, Pesquisador participante), Isabela Camargo Graduanda no curso de Odontologia da FOP/UNICAMP, Pesquisadora participante), Eduardo Martinelli Franco (Biólogo, Mestrando no PPG em Biologia Bucodental, Área de Microbiologia e Imunologia, da FOP/UNICAMP, Pesquisador participante), Geovanny Nilton Cuya Salvatierra (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Biologia Bucodental, Área de Microbiologia e Imunologia, da FOP/UNICAMP, Pesquisador participante), Lívia Araujo Alves (Cirurgiã-dentista, Pós-doutoranda no Departamento de Diagnóstico Oral da FOP/UNICAMP, Pesquisadora participante) e Renata de Oliveira Mattos-Graner (Cirurgiã-dentista, Docente do Departamento de Diagnóstico Oral da FOP/UNICAMP, Pesquisadora participante), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 03 de Junho de 2019

Assinado por:
jacks jorge junior
(Coordenador(a))

Anexo 3 – Iniciação Científica

Consulta de Despachos			
Para consultar o despacho selecione o link sobre a sua divulgação.			
Processo	2017/23183-4		
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo		
Situação	Em Execução		
Vigência	01/02/2018 a 31/07/2021		
Beneficiário	Isabela Camargo  		
Responsável	Renata de Oliveira Mattos      		
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP		

Despachos			
Situação	Emissão ▼	Objeto de Análise	Resultado
Divulgado	18/01/2018	Proposta Inicial	Concedido
Divulgado	02/02/2018	SM 001 - Alteração de Vigência	Concedido
Divulgado	18/07/2018	Relatório Científico 1	Aprovado
Divulgado	18/04/2019	SM 002 - Renovação de Bolsa	Concedido
Divulgado	30/08/2019	Relatório Científico 2	Aprovado
Divulgado	17/06/2020	Relatório Científico 3	Aprovado
Divulgado	28/10/2020	Relatório Científico 4	Aprovado
Divulgado	16/11/2020	SM 003 - Renovação de Bolsa	Concedido
Divulgado	24/02/2021	Relatório Científico 5	Aprovado
Divulgado		SM 004 - Renovação de Bolsa	Cancelado
Divulgado		Relatório Científico 6	Aprovado
Divulgado		SM 005 - Renovação de Bolsa	Concedido