

**UNICAMP**

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

**VICTOR ARAGÃO ABREU DE FREITAS**

**Análise do papel de exopolissacarídeos e DNA  
extracelular no escape de *Streptococcus sanguinis* ao  
sistema complemento**

Piracicaba

2023

**VICTOR ARAGÃO ABREU DE FREITAS**

**Análise do papel de exopolissacarídeos e DNA  
extracelular no escape de *Streptococcus sanguinis* ao  
sistema complemento**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata de Oliveira Mattos Graner.

Coorientadora: Profa. Dra. Livia Araújo Alves

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO VICTOR ARAGÃO ABREU DE FREITAS E ORIENTADA PELA PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER.

Piracicaba

2023

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

F884a Freitas, Victor Aragão Abreu de, 1991-  
Análise do papel de exopolissacarídeos e DNA extracelular no escape de *Streptococcus sanguinis* ao sistema complemento / Victor Aragão Abreu de Freitas. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos Graner.

Coorientador: Livia Araújo Alves.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Streptococcus sanguinis*. 2. Complemento C3b. 3. Matriz extracelular de substâncias poliméricas. 4. Glucanas. 5. DNA ribossômico. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira, 1971-. II. Alves, Livia Araújo, 1988-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** The role of exopolysaccharides and extracellular DNA in *Streptococcus sanguinis* escape from complement system

**Palavras-chave em inglês:**

*Streptococcus sanguinis*

Complement C3b

Extracellular polymeric substance matrix

Glucans

DNA, ribosomal

**Área de concentração:** Microbiologia e Imunologia

**Titulação:** Doutor em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

Renata de Oliveira Mattos Graner [Orientador]

Marlise Inéz Klein Furlan

Antônio Pedro Ricomoni Filho

Rodrigo Alex Arthur

Julianna Joanna de Carvalho Moraes Baldin

**Data de defesa:** 17-03-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7942-6367>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7396833006202634>



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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 17 de março de 2023, considerou o candidato VICTOR ARAGÃO ABREU DE FREITAS aprovado.

PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS-GRANER

PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARLISE INÊZ KLEIN FURLAN

PROF. Dr. ANTÔNIO PEDRO RICOMINI FILHO

PROF. Dr. RODRIGO ALEX ARTHUR

PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. JULIANA JOANNA DE CARVALHO MORAES

A ata de defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/sistema de fluxo de dissertação/Tese e na secretaria do programa da unidade.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabalho à todos os neurodivergentes que nascem com o desafio de se encaixar em um mundo gerido por neuróticos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) pelo apoio institucional.

À todos os funcionários, professores e alunos que compõem o Programa de Pós-Graduação em em Biologia Buco-Dental FOP/UNICAMP pela disponibilidade em ajudar, pelo conhecimento trocado.

À minha orientadora, Profa Dra Renata de Oliveira Mattos-Graner, pela orientação, pelos ensinamentos, pelas oportunidades proporcionadas durante a pesquisa e, acima de tudo, pela paciência e confiança.

À minha orientadora Co-orientadora, Livia Alves Araújo por me ensinar, com paciência, todas as técnicas de biologia molecular desenvolvida nesse trabalho, pela amizade e companheirismo.

Ao Professor Antônio Pedro Ricomini Filho pela parceria para realizar a caracterização da produção de polissacarídeos, técnica fundamental para este trabalho.

À Professora Débora Campanella Bastos por realizar as aquisições das amostras no citômetro de fluxo, pela amizade, conselhos e atenção.

À todos os membros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia que contribuíram com a execução desse trabalho.

Ao Centro de Microscopia e Imagens CMI-FOP/UNICAMP pelas análises de microscopia de transmissão que foram muito importante para esse trabalho.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional a cada sonho que juntos tornamos realidade, por me ensinarem que conhecimento é o maior bem que um homem pode adquirir ao longo da vida, pelo carinho e por me darem sentido à vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho, sob número 2018/12248-0 (Bolsa de Doutorado), 2018/02054-4 e 2021/13074-9 (Auxílios Regular à Pesquisa).

## RESUMO

*Streptococcus sanguinis* é uma espécie bacteriana comensal abundante da cavidade bucal, a qual é capaz de iniciar a colonização dos dentes por escapar da ação de anticorpos salivares S-IgA1 através da expressão de proteases de IgA1, e por produzir DNA extracelular (eDNA) e exopolissacarídeos (EPS) derivados da sacarose. Esta espécie é também comumente associada a infecções cardiovasculares oportunistas, o que sugere capacidade de escapar das funções de defesa da corrente sanguínea mediada pelo sistema complemento. O objetivo deste estudo foi investigar os papéis de eDNA, EPS derivados da sacarose e de IgA1-protease na capacidade de *S. sanguinis* de escapar do sistema complemento. Para isto, cepas mutantes knockout dos genes que codificam a protease de IgA1 (*iga*), a enzima piruvato oxidase requerida para a produção de eDNA (*spxB*) e a glicosiltransferase (*gtfP*) requerida para a síntese de EPS a partir da sacarose, foram obtidas a partir da cepa *S. sanguinis* SK36 (e respectivamente designadas SKiga, SKspxB e SKgtfP). As mutantes foram então comparadas com a cepa parental quanto à susceptibilidade à deposição de C3b e fagocitose por neutrófilos (PMN) isolados de sangue periférico humano, em ensaios de citometria de fluxo. Cinco cepas isoladas da cavidade bucal ou da corrente sanguínea foram também analisadas quanto à produção de eDNA e/ou EPS sob diferentes condições e quanto aos perfis de ligação à C3b. Os efeitos do tratamento bacteriano com DNase I na deposição de C3b e na opsonofagocitose por PMN também foram analisadas em todas as cepas estudadas. A deleção de *spxB* e *gtfP* promoveu aumento significativo na deposição de C3b e na opsonofagocitose por PMN sob condições que promovem a produção de eDNA e de EPS, respectivamente (Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn;  $p < 0,05$ ). A deposição de C3b e/ou opsonofagocitose por PMN também foram significativamente aumentadas nas cepas SK36 e SK160 que produziam maiores quantidades de eDNA após o tratamento com DNase I, comparadas às mesmas cepas não tratadas. Além disso, entre as cepas mais produtoras de EPS, o crescimento em meio livre de sacarose (para eliminar a síntese de EPS) promoveu maior deposição de C3b em comparação à mesma cepa cultivada na presença de sacarose ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na deposição de C3b ou na opsonofagocitose por PMN entre SKiga e SK36. Portanto, a produção de eDNA ou de EPS derivados da sacarose contribuem para o escape de *S. sanguinis* à imunidade mediada pelo sistema complemento, enquanto que a expressão de protease de IgA1 não afeta significativamente a susceptibilidade de SK36 ao sistema complemento.

**Palavras-chave:** *Streptococcus sanguinis*. Complemento C3b. Matriz extracelular de substâncias poliméricas. Glucanas. DNA ribossômico.

## ABSTRACT

*Streptococcus sanguinis* is an abundant commensal bacterial species of the oral cavity capable of initiating biofilms on tooth surfaces by evading salivary S-IgA1 antibodies through the expression of IgA1 protease, and by producing extracellular DNA (eDNA), as well as exopolysaccharides (EPS) from sucrose. This species is also commonly associated with opportunistic cardiovascular infections, which might imply the capacity to evade blood clearance immune functions mediated by the complement system. The aim of this study was to investigate the roles of eDNA, sucrose-derived EPS and IgA1 protease in the capacity of *S. sanguinis* to evade the complement system. To this end, deletion mutants of genes encoding for the IgA1 protease (*iga*), pyruvate oxidase required for the production of eDNA (*spxB*), and glucosyltransferase P (*gtfP*) required for the synthesis of EPS from sucrose were obtained in the *S. sanguinis* strain SK36 (respectively named SKiga, SKspxB and SKgtfP). Mutants were then compared with parent strain regarding their susceptibility to C3b deposition and to phagocytosis by neutrophils (PMN) isolated from human peripheral blood, in flow cytometry assays. Five wild-type strains from the oral cavity or from the bloodstream were also analyzed regarding their production of eDNA and/or EPS at different conditions, as well as to their profiles of C3b binding. The effects of bacterial treatment with DNase I in C3b binding and opsonophagocytosis was also assessed in all the studied strains. Deletion of *spxB* and *gtfP* promoted significant increases in C3b deposition and opsonophagocytosis by PMN under conditions which promote production of eDNA and sucrose-derived EPS, respectively (Kruskal Wallis with *post hoc* Dunn's test;  $p < 0.05$ ). In addition, C3b deposition and/or opsonophagocytosis by PMN were significantly increased in wild-type strains with high production of eDNA after treatment with DNase I, as compared to the same strain not treated with DNase I. Moreover, strains producing sucrose-derived EPS showed increased C3b deposition when grown in the absence of sucrose (to avoid EPS synthesis), when compared to the same strain grown in the presence of sucrose ( $p < 0.05$ ). No significant difference in C3b deposition or in opsonophagocytosis were found in SKiga as compared to SK36. These findings indicate that the production of eDNA and sucrose-derived EPS contribute to *S. sanguinis* evasion to complement-mediated immunity, whereas expression of IgA proteases does not significantly affect the capacity of SK36 to evade the complement system.

**Key Words:** *Streptococcus sanguinis*. Complement C3b. Extracellular polymeric substance matrix. Glucans. DNA, ribosomal.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gel de Agarose (1%) contendo 10 µl dos produtos de PCR P1-P2 e P3-P4 utilizados para construção dos mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga 33
- Figura 2 - Gel de agarose (1%) contendo 10 µl de reações de PCR para amplificação dos fragmentos digeridos e ligados P1/E2 e E1/P4 utilizados para construção dos mutantes SKspxB, SKgtfP 34
- Figura 3 - Gel de agarose (1%) contendo 10 µl de produtos de PCR amplificados com o par de primers P1/P4 utilizados na construção dos mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga 35
- Figura 4 - Confirmação por PCR dos mutantes utilizando-se pares de primers E1/E2, P1/E2 e E1/P4 dos transformantes recuperados em meio acrescido de eritromicina, para obtenção dos mutantes SKspxB SKgtfP e SKiga 36
- Figura 5 - Produto de PCR e plasmídeo pDL278 utilizados para construção das cepas complementadas SKspxB+, SKgtfP+ e SKiga+. 37
- Figura 6 - Confirmação da construção do mutante complementado SKspxB+ 38
- Figura 7 - Gel de agarose (1,2%) mostrando a integridade das amostras de RNA extraído (0,5 µg/canaleta) 40
- Figura 8 - Análise de Gram das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivas mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga 48
- Figura 9 - Crescimento planctônico das cepas de *S. sanguinis* SK36 e respectivas mutantes isogênicas SKspxB, SKgtfP e SKiga em diferentes meios de culturas 49
- Figura 10 - Crescimento planctônico das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivas mutantes isogênicas SKspxB, SKgtfP e SKiga em diferentes meios de culturas, sob aeração (agitação).. 50
- Figura 11 - Níveis de transcritos dos genes *spxB*, *gtfP* e *iga* nas cepas de *S. sanguinis* SK36 51

Figura 12 -	Quantidades de eDNA em sobrenadantes de cultura planctônica das cepas <i>S. sanguinis</i> SK36, SKspxB, SKgtfP e SKiga em diferentes fases de crescimento	52
Figura 13 -	Efeito da inativação de <i>gtfP</i> na produção de EPS por <i>S. sanguinis</i>	53
Figura 14 -	Efeito do eDNA no escape de <i>S. sanguinis</i> à deposição de C3b sistema complemento	55
Figura 15 -	Influência da inativação de <i>gtfP</i> na deposição de C3b do sistema complemento	56
Figura 16 -	Análises da produção de EPS solúveis e insolúveis em água por cepas <i>S. sanguinis</i>	58
Figura 17 -	Efeito dos EPS derivados da sacarose na deposição de C3b e fagocitose por PMN em cepas <i>S. sanguinis</i>	60
Figura 18 -	Níveis relativos de transcritos de gene <i>gtfP</i> nas cepas de isolados de <i>S. sanguinis</i>	61
Figura 19 -	Análises dos polimorfismos de GtfP (1.568 aa) entre as cepas selvagens de <i>S. sanguinis</i>	62
Figura 20 -	Análises de MET da superfície da parede celular de cepas <i>S. sanguinis</i> crescidas em meio livre de sacarose	63
Figura 21 -	Efeito da deleção de <i>iga</i> em <i>S. sanguinis</i> na deposição de C3b e opsonização por PMN	64

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Cepas estudadas na pesquisa	30
Tabela 2 -	Oligonucleotídeos utilizados para construção das cepas isogênicas e complementadas	32
Tabela 3 -	Oligonucleotídeos utilizados para reações de qPCR	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ADOTADAS

<b>A<sub>550nm</sub></b>	: Absorbância no comprimento de onda de 550 nanômetros.
<b>A<sub>570nm</sub></b>	: Absorbância no comprimento de onda de 575 nanômetros.
<b>A<sub>260nm</sub></b>	: Absorbância no comprimento de onda de 260 nanômetros.
<b>A<sub>280nm</sub></b>	: Absorbância no comprimento de onda de 280 nanômetros.
<b>ATCC</b>	: <i>American Type Culture Collection</i> .
<b>BHI</b>	: Infusão de cérebro e coração comercial ( <u>B</u> rain <u>H</u> eart <u>I</u> nfusion).
<b>BHIS</b>	: BHI acrescido com 1% de sacarose.
<b>BLAST</b>	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> .
<b>cDNA</b>	: Fragmentos de DNA fita simples obtidos a partir da transcrição reversa de moldes de RNA.
<b>DNA</b>	: Ácido desoxirribonucleico genômico ( <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid).
<b>dNTP</b>	: Trifosfatos de desoxirribonucleotídeos.
<b>eDNA</b>	: DNA no meio extracelular.
<b>EPS</b>	: Polissacarídeos extracelulares
<b>EDTA</b>	: ácido etilenodiamino tetra-acético.
<b>et al.</b>	: e outros (de et alli).
<b>Fase log</b>	: Fase logarítmica de crescimento bacteriano.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Peróxido de hidrogênio.
<b>mL</b>	: mililitro.
<b>mM</b>	: milimolar.
<b>pb/bp</b>	: pares de base.
<b>PCR</b>	: reação em cadeia da polimerase (de <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction).
<b>pH</b>	: Potencial hidrogênico.
<b>qPCR</b>	: PCR em tempo real quantitativa.
<b>RNA</b>	: ácido ribonucleico (de <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid).

<b>RT</b>	: transcrição reversa que dará origem a cDNA (de <i>Reverse Transcription</i> ).
<b>rpm</b>	: rotações por minuto.
<b>MQD</b>	: Meio quimicamente definido.
<b>MQDS</b>	: Meio quimicamente definido suplementado com 1% de sacarose.
<b><i>spxB</i></b>	: gene que induz a produção de peróxido de hidrogênio.
<b>TA</b>	: temperatura ambiente.
<b>TCS</b>	: sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (de <i>Two Component System</i> ).
<b>TE</b>	: tampão 10 mM tris, 1mM EDTA, pH 8.0
<b>THB</b>	: caldo Todd-Hewitt (de Todd- hewitt Broth)
<b>U</b>	: unidade (s).
<b><i>vicK</i></b>	: gene codificador da proteína quinase sensora de superfície VicK (de <i>Virulence Control Kinase</i> ).
<b>µg</b>	: micrograma
<b>10% CO<sub>2</sub></b>	: pressão parcial de carbono a 10%.
<b>16SRNA<sub>r</sub></b>	: gene codificador do RNA ribossômico 16S.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 <i>Streptococcus sanguinis</i> como espécie comensal pioneira dos biofilmes dentários e seu envolvimento em doenças cardiovasculares	20
2.2 Papel de exopolissacarídeos (EPS) e DNA extracelular (eDNA) produzidos por estreptococos dos biofilmes dentários nas respostas de defesa do hospedeiro	22
2.3 Funções do sistema complemento na proteção dos tecidos bucais e no controle de bacteremias	25
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Cepas e condições de cultivo	29
4.2 Amostras de soro	31
4.3 Construção dos mutantes <i>knockout</i> dos genes <i>spxB</i> , <i>gtfP</i> e <i>iga</i> em <i>S. sanguinis</i>	31
4.4 Construção das cepas complementadas	37
4.5 Análise da expressão de genes <i>spxB</i> , <i>gtfP</i> e <i>iga</i> em SK36 nas cepas mutantes e isolados clínicos	39
4.6 Quantificação do eDNA	41
4.7 Determinação da produção de EPS solúveis e insolúveis	42
4.8 Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET)	43
4.9 Análise dos polimorfismos de GtfP das cepas <i>S. sanguinis</i>	43
4.10 Tratamento das cepas estudadas com DNase	44

4.11 Análises da deposição de C3b/iC3b sobre as cepas estudadas	44
4.12 Ensaio de opsonofagocitose por PMN isolados de sangue periférico	45
4.13 Análise dos resultados	46
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>47</b>
5.1 Caracterização das cepas mutantes SKgtfP, SKspxB e SKigA e mutantes complementadas	47
5.2 Análise do efeito de eDNA na susceptibilidade de <i>S. sanguinis</i> à imunidade mediada pelo sistema complemento	54
5.3 Análise do efeito de EPS derivados da sacarose na susceptibilidade de <i>S. sanguinis</i> à imunidade mediada pelo sistema complemento	55
5.4 Análise da participação de protease de IgA1 na susceptibilidade de <i>S. sanguinis</i> à imunidade mediada pelo sistema complemento	63
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE 1 – ALINHAMENTO MÚLTIPLO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS GTFP</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>91</b>
Anexo 2 - Verificação de originalidade e prevenção de plágio	91
Anexo 3 - Comitê de Ética em Pesquisa	92

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Streptococcus* correspondem aos microrganismos comensais mais abundantes nos diversos sítios da cavidade bucal sob condições de saúde, sendo genericamente referidos como estreptococos viridans, pois a maior parte das cepas das espécies bucais deste gênero forma um halo esverdeado circundando as colônias crescidas em ágar sangue, definido como hemólise parcial ( $\alpha$ -hemólise), decorrente da oxidação da oxi-hemoglobina presente no meio de cultura (Facklam et al., 2002; McDevitt et al., 2020). Apesar do estilo de vida predominantemente comensal, estes microrganismos demonstram grande diversidade fenotípica inter- e intra-espécie, a qual está relacionada a trocas horizontais de material genético, sob pressões seletivas do hospedeiro e/ou do uso de antibióticos (Bessen et al., 2010; Do et al., 2011; Mattos-Graner e Duncan, 2017; Sitkiewicz et al., 2017; Oliveira et al., 2021). Variações fenotípicas intra-espécie estão também relacionadas a mutações em sistemas reguladores da transcrição gênica, as quais resultam na seleção de cepas que super-expressam genes de escape às funções imunológicas do hospedeiro e/ou genes de resistência antibióticos (Mattos-Graner e Duncan, 2017; Sitkiewicz et al., 2017; Oliveira et al., 2021).

Entre os estreptococos bucais, a espécie *Streptococcus sanguinis* é abundante em diversos sítios bucais, sendo uma das espécies com maior capacidade de iniciar a colonização dos dentes para a formação de biofilmes (Kreth et al., 2016). Embora considerada uma espécie comensal benéfica da cavidade bucal, *S. sanguinis* é também uma das espécies de estreptococos bucais frequentemente associada à endocardite infecciosa (Douglass et al., 1993; Di Filippo et al., 2006) e à aterosclerose (Nakano et al., 2006). É possível portanto, que *S. sanguinis* apresente maior capacidade de persistir na corrente sanguínea e tecidos extra-bucais do que outras espécies de estreptococos orais. Consistentemente, a espécie *S. sanguinis* foi originalmente identificada entre isolados na corrente sanguínea de pacientes com endocardite infecciosa (Niven e White, 1946), fato que resultou na sua designação taxonômica como *Streptococcus sanguis* (de sangue em latim: *sanguis*), nomenclatura posteriormente ajustada para *Streptococcus sanguinis* (revisado em Kreth et al., 2016). Apesar da abundância desta espécie nos sítios bucais e das evidências de que *S. sanguinis* apresenta maior capacidade de promover infecções cardiovasculares, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais esta espécie sobrevive aos fatores imunológicos que atuam na corrente sanguínea e tecidos do sistema

cardiovascular. Estudos recentes de rastreamento genético de larga escala indicam que *S. sanguinis* é capaz de se adaptar metabolicamente ao soro humano a partir da expressão de genes para o metabolismo de purinas e sistemas de transporte de metais (Zhu et al., 2021). Estes estudos foram, entretanto, realizados com soro inativado pelo calor, para inativação do sistema complemento, um braço chave da imunidade contra microrganismos no sangue e tecidos do hospedeiro.

Um dos mecanismos mais comuns de escape ao sistema complemento utilizados por cepas patogênicas de *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* é a produção de cápsula polissacarídica (Kang et al., 2012; Echlin et al., 2016). Embora a produção de cápsulas por espécies bucais de estreptococos seja limitada a algumas cepas (Sorensen et al., 2016), sabe-se que glucanos insolúveis produzidos a partir da sacarose pela espécie cariogênica *Streptococcus mutans* podem atuar de forma análoga a cápsulas anti-opsonizantes em cepas de *S. mutans* ou em cepas de outras espécies de estreptococos capazes de se ligar a estes exopolissacarídeos (EPS) a partir de proteínas ligadoras glucano, como reportado para *Streptococcus mitis* (Alves et al., 2018, 2019). *Streptococcus sanguinis* expressa uma única enzima para a síntese de glucanos a partir da sacarose, a glicosiltransferase P (GtfP) (Xu et al., 2018). Diferente das Gtfs produzidas por *S. mutans* (GtfB, GtfC, GtfD), os glucanos sintetizados por GtfP tem maior solubilidade e não conferem estabilidade a biofilmes em modelos *in vitro* (Hamada et al., 1981; Moraes et al., 2014; Alves et al., 2022). Apesar destas características, a formação de biofilmes *in vitro* por *S. sanguinis* é aumentada em meios de cultura suplementados com sacarose (Ge et al., 2008; Zheng et al., 2011; Moraes et al., 2014; Alves et al., 2022). A capacidade de *S. sanguinis* de iniciar biofilmes é favorecida pela produção de DNA extracelular (eDNA) (Kreth et al., 2009; Moraes et al., 2014). Os mecanismos de produção de eDNA por *S. sanguinis* ainda não são completamente compreendidos, mas envolvem a síntese de peróxido de hidrogênio pela enzima piruvato-oxidase SpxB, na presença de oxigênio molecular (Kreth et al., 2009). Enzimas SpxB de estreptococos viridans convertem piruvato, fosfatos inorgânicos e O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e acetil-fosfato (AcP), um importante metabólito utilizado para fosforilação de reguladores de transcrição, assim como para a síntese de ATP (Ramos-Montanez et al., 2010). Em *S. sanguinis*, deleção do gene codificador desta enzima (*spxB*), compromete a produção de eDNA, assim como a formação de biofilmes (Kreth et al., 2009). Por outro lado, *S. sanguinis* não parece contribuir para a maturação de biofilmes quando em cultivo com outras espécies de

estreptococos bucais na presença de sacarose (Yoshida et al., 2014), possivelmente porque os glucanos produzidos por GtfP são solúveis. A menor capacidade de promover aumento da biomassa e/ou o aumento da estabilidade de biofilmes na presença de sacarose possivelmente seja um fenótipo desejável entre bactérias comensais benéficas que colonizam os dentes, como é o caso de *S. sanguinis*. A estabilidade dos biofilmes formados por *S. sanguinis* possivelmente dependa também da produção de eDNA (Moraes et al., 2014; Camargo et al., 2018; Alves et al., 2022) e possivelmente, de fibras amilóides (dados não publicados). Outra função potencialmente relacionada à maior capacidade de *S. sanguinis* colonizar as superfícies dentárias é a expressão da enzima ancorada à parede celular, IgA1-protease (codificada por *iga*). Embora as funções biológicas desta protease não tenham sido suficientemente investigadas em *S. sanguinis*, uma hipótese aceita é que esta enzima favoreça a ligação de *S. sanguinis* à película adquirida do esmalte por clivar anticorpos S-IgA1 (abundantes na saliva e outras secreções), para escape ao bloqueio de suas adesinas de superfície e à aglutinação mediada por S-IgA1 (Kilian et al., 1988). Estudos em *S. pneumoniae*, outra espécie produtora de IgA1-protease, indicam que a expressão de IgA1-protease por cepas *S. pneumoniae* confere proteção contra a fagocitose por PMN mediada pelo sistema complemento (Janoff et al., 2014). Há também evidências de que anticorpos IgA1 podem ativar o sistema complemento pela via da lectina (Roos et al., 2001), o que implicaria numa função de IgA1-protease no escape ao sistema complemento. Uma vez que *S. sanguinis* é uma das primeiras espécies a colonizar a cavidade bucal durante a erupção dos dentes (Caufield et al., 2011), fase em que a superfície dentária é mais abundantemente banhada pelo soro presente no fluido crevicular, espera-se que esta espécie seja também capaz de escapar da imunidade mediada pelo sistema complemento. Consistentemente com esta hipótese, cepas da espécie *S. sanguinis* demonstram menor susceptibilidade à deposição de C3b do sistema complemento, quando comparadas a cepas de outras espécies comensais de estreptococos bucais (Alves et al., 2019). Assim, este estudo investiga a participação da produção de exopolissacarídeos (EPS) derivados da sacarose e de eDNA, assim como a expressão de IgA1-protease na capacidade de *S. sanguinis* escapar da imunidade mediada pelo sistema complemento. Para isto, foram construídas cepas e mutantes isogênicas dos genes *gtfP*, *spxB* e *iga* a partir da cepa de *S. sanguinis* SK36. O efeito da inativação destes genes nos fenótipos relacionados à produção de EPS derivados da sacarose e produção de eDNA, incluindo-se a formação de biofilmes na presença ou ausência de sacarose, foram então investigados. Os efeitos da

deleção destes genes na deposição de C3b do complemento e na opsonofagocitose por neutrófilos de sangue periférico humano foram então investigados em análises *in vitro*. Finalmente, o efeito dos EPS derivados da sacarose e do eDNA no escape bacteriano à deposição de C3b e opsonofagocitose por PMN foram avaliados em diferentes cepas selvagens de *S. sanguinis* isoladas da cavidade bucal e da corrente sanguínea.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Streptococcus sanguinis* como espécie comensal pioneira dos biofilmes dentários e seu envolvimento em doenças cardiovasculares

Os biofilmes dentários podem incluir centenas de espécies bacterianas, dependendo do seu estágio de formação e maturação e das pressões ambientais que modulam este processo, como a disponibilidade de açúcares da dieta, alterações no fluxo salivar e práticas de higienização dos dentes (Marsh e Zaura, 2017). Além disto, padrões de resposta imune inata e adaptativa presentes na saliva e fluido do sulco gengival (formado principalmente pelo transudato do soro através do epitélio gengival) modulam a colonização dos dentes e a maturação dos biofilmes (Kreth et al., 2009; Darveau, 2010). Os biofilmes dentários se iniciam logo após a formação da película adquirida (PA), uma camada acelular firmemente aderida à superfície dentária formada por glicoproteínas da saliva, soro e componentes epiteliais (Lee et al., 2013a). Sabe-se que *S. sanguinis* é uma das principais espécies bacterianas capaz de iniciar biofilmes dentários (Diaz et al., 2006; Caufield et al., 2000) e assim como outras espécies de estreptococos comensais (*Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*), são predominantes na placa dental durante as primeiras 8 a 24 h de formação (Diaz et al., 2006). A alta competitividade de *S. sanguinis* como espécie pioneira dos dentes ainda não é totalmente compreendida, mas parece estar associada à expressão de adesinas com alta afinidade à PA e à produção de proteases de IgA1 (Gong et al., 2000). Ao iniciar a colonização dos dentes, *S. sanguinis* modifica as condições biofísicas locais, influenciando na sucessão de espécies dos biofilmes. Por exemplo, *S. sanguinis* reduz a tensão de O<sub>2</sub> e produz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produto capaz de inibir espécies potencialmente patogênicas do biofilme dentário como *Streptococcus mutans* (principal patógeno da cárie dentária) e *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno importante da periodontite (Kreth et al., 2016). Por estas razões, a espécie *S. sanguinis* é considerada uma espécie benéfica dos biofilmes dentários.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, 31% da população global morre em decorrência de doenças cardiovasculares (17,7 milhões de mortes/ano) (WHO, 2017). Além dos fatores clássicos de risco (por exemplo, tabagismo, dieta inadequada e falta de atividade física), a associação entre doenças cardiovasculares e infecções bucais envolvendo microrganismos dos biofilmes dentários tem sido consistentemente observada

(Li et al., 2000; Lee et al., 2013b; Chhibber-Goel et al., 2016). Os biofilmes dentários representam uma enorme fonte de microrganismos com acesso à corrente sanguínea, através do tecido gengival, o qual é altamente vascularizado (Curtis et al., 2011).

As bacteremias de origem bucal estão associadas ao aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda como proteína C-reativa (CRP) e fibrinogênio (Wu et al., 2000), os quais são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Corrado et al., 2006). Microrganismos bucais capazes de resistir a fatores de defesa do sangue podem ainda promover infecções no tecido endotelial dos vasos sanguíneos promovendo doenças cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais (Ihara e Yamamoto, 2016). Algumas espécies bacterianas dos biofilmes dentários são ainda detectadas com frequência relativamente alta em espécimes de ateromas, assim como em válvulas cardíacas de pacientes com endocardite infecciosa, o que sugere a expressão de funções de virulência sistêmica (Li et al., 2000; Nakano et al., 2006; Lee et al., 2013b; Chhibber-Goel et al., 2016).

Não somente intervenções cirúrgicas na cavidade bucal, como também práticas rotineiras pessoais, como a escovação dental, podem promover o acesso de microrganismos da placa dental à corrente sanguínea (Lockhart et al., 2009). Este processo é favorecido pela inflamação do tecido gengival decorrente do acúmulo de biofilme dental promovido por pressões seletivas locais e/ou sistêmicas que comprometem o controle pelo hospedeiro, como por exemplo, uma dieta rica em açúcares, deficiências de higiene oral, alterações das funções imunológicas da saliva e do tecido periodontal (Li et al. 2000; Chhibber-Goel et al., 2016). Entretanto, diversos estudos indicam variações significativas na frequência de detecção na corrente sanguínea entre espécies bacterianas comuns dos biofilmes dentários (Nakano et al., 2006; Lockhart et al., 2009; Fernandes et al., 2014; revisado por Chhibber-Goel et al., 2016). Embora diferenças nos métodos moleculares de detecção de cada espécie bacteriana possam contribuir para estas variações, estudos que comparam a frequência de DNA de diversas espécies de forma simultânea e utilizando-se de PCR com primers específicos indicam que *S. mutans* é uma das espécies bucais mais prevalentemente encontradas em espécimes de válvulas cardíacas de pacientes com endocardite infecciosa e em ateromas (Nakano et al., 2006; Fernandes et al., 2014), seguida da espécie *S. sanguinis*, detectada entre 17,1 e 25,9% dos espécimes de válvula cardíaca e ateromas, respectivamente (Nakano et al., 2006). Outros estudos indicam ainda que *S. sanguinis* é

uma das espécies de estreptococos bucais predominante entre isolados associados a endocardite infecciosa no Reino Unido (Douglas et al. 1993) e em pacientes com doença coronária congênita (Di Filippo et al., 2006). A frequente associação de *S. sanguinis* em espécimes de tecido cardiovascular em comparação a outras espécies da cavidade bucal, não apenas indica que estes microrganismos tem frequente acesso à corrente sanguínea, mas que possivelmente expressam funções que os tornam capazes de escapar dos fatores de defesa presentes no sangue e de se estabelecer em tecidos cardiovasculares.

## **2.2 Papel de exopolissacarídeos (EPS) e DNA extracelular (eDNA) produzidos por estreptococos dos biofilmes dentários nas respostas de defesa do hospedeiro**

Estima-se que cerca de 30.000 PMN atravessem o epitélio do sulco gengival por minuto para atingir o sulco gengival, o que é crucial para evitar a penetração de bactérias do biofilme no tecido periodontal altamente vascularizado (Curtis et al., 2011). A opsonofagocitose por PMN é também uma das principais funções de eliminação de microrganismos da corrente sanguínea, o que explica o fato de que os principais patógenos de humanos expressam múltiplas funções de escape à opsonização pelo sistema complemento e/ou por anticorpos (Lambris et al., 2009). Entre estes, a síntese de cápsula de polissacarídeos é reconhecida como uma importante função anti-opsonizante expressa por linhagens patogênicas de estreptococos incluindo-se *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (Kang et al., 2012; Echlin et al., 2016). Mais recentemente, em *S. mutans*, foi observado que a síntese e ligação a exopolissacarídeos (EPS) sintetizados a partir da sacarose (glucanos insolúveis em água) tem importante papel no escape à opsonofagocitose mediada pelo sistema complemento (Alves et al., 2016). Estes polissacarídeos são sintetizados pelas enzimas glicosiltransferase B (GtfB) e glicosiltransferase C (GtfC) e se ligam de forma estável à superfície de *S. mutans* através das proteínas de superfície EpsC (*enzyme for exopolysaccharide synthesis C*) e GbpC (*Glucan-binding protein C*) (Alves et al., 2016). Ambos os genes codificadores destas proteínas, *epsC* e *gbpC*, tem expressão significativamente aumentada entre isolados *S. mutans* de bacteremias e endocardite infecciosa, quando comparados a isolados restritos à cavidade bucal. Além disto, os isolados de infecções sistêmicas apresentam maior capacidade de se ligar a glucanos, de escapar da opsonofagocitose e de sobreviver em sangue humano (Alves et al., 2016). Pouco se sabe, entretanto, sobre os mecanismos de

virulência sistêmica de *S. sanguinis*, embora diversos estudos tenham sido realizados para detectar genes capazes de causar endocardites em modelos animais (Ge et al., 2008; Turner et al., 2009). Diferente de *S. mutans*, *S. sanguinis* não expressa GtfB e GtfC, mas uma única glicosiltransferase, GtfP (codificada pelo gene *gtfP*), capaz de sintetizar glucanos a partir da sacarose (Xu et al., 2007). Entretanto, os glucanos sintetizados por GtfP são solúveis e pouco estáveis, além de contribuir de forma modesta para formação de biofilmes nesta espécie (Moraes et al., 2014; Yoshida et al., 2014). Apesar disto, a suplementação de meio de cultura com sacarose aumenta a formação de biofilme *in vitro* por *S. sanguinis* (Moraes et al., 2014), sugerindo que os glucanos solúveis participem de algum modo na formação da matriz extracelular de biofilmes.

Os fatores de virulência sistêmica identificados em *S. sanguinis* até o momento são ainda restritos a algumas cepas (Kreth et al., 2016). Diferente de *S. mutans* e de outras espécies de estreptococos presentes nos biofilmes dentários, *S. sanguinis* tem baixa capacidade de induzir a ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a resposta imune humoral em camundongos, quando comparado a outros estreptococos orais (Salam et al., 2006; Kreth et al., 2016). Estudos do nosso grupo de pesquisa revelaram ainda que cepas de *S. sanguinis* tem menor susceptibilidade à deposição do sistema complemento do que cepas de outras espécies bucais, incluindo-se *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e *S. mutans* (Alves et al., 2019). Estes achados são compatíveis com a hipótese de que cepas de *S. sanguinis* são resistentes à imunidade mediada pelo sistema complemento. Portanto, compreender os mecanismos através dos quais *S. sanguinis* escapa ao sistema complemento é importante para elucidar os mecanismos de virulência sistêmica desta espécie e possivelmente, para endermos os mecanismos pelos quais *S. sanguinis* predomina na cavidade bucal em situação de homeostase com o hospedeiro. Estudos em *S. mutans* e em outras espécies bacterianas dos biofilmes dentários indicam que os exopolissacarídeos não tem apenas uma função estrutural na matriz extracelular de biofilmes, mas medeiam a ligação bacteriana ao eDNA (Liao et al., 2014). O papel dos exopolissacarídeos sintetizados por *S. sanguinis* na evasão à opsonofagocitose precisa ser investigado.

Além da síntese de EPS, ambas as espécies *S. mutans* e *S. sanguinis* produzem eDNA para formar biofilmes (Stipp et al., 2013; Moraes et al., 2014). Entretanto, *S. sanguinis* parece ser mais dependente da produção de eDNA para formar biofilmes do que *S. mutans*,

porque forma polissacarídeos extracelulares poucos estáveis (glucanos com maior solubilidade em água), os quais são diferentes dos glucanos altamente insolúveis sintetizados a partir de enzimas GtfB e GtfC de *S. mutans* (Moraes et al., 2014; Camargo et al., 2018). O importante papel de eDNA como componente da matriz extracelular de biofilmes bacterianos tem fundamentado estudos para aplicação de enzimas nucleases (DNase I e outras) como agentes para inibir e/ou desorganizar biofilmes microbianos (Hymes et al., 2013; Jakubovics et al., 2013; Okshevsky e Meyer, 2015). *S. sanguinis* parece capaz de liberar eDNA de forma independente da lise celular, através de um processo não completamente compreendido, mas que envolve a ativação de hidrolases de mureína induzida pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir da enzima piruvato-oxidase (SpxB). SpxB converte fosfato inorgânico e O<sub>2</sub> em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e acetil fosfato (Ramos-Montanez et al., 2008; Kreth et al., 2009). A liberação de eDNA associada à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é, portanto, dependente da presença de oxigênio, justificando seu importante papel nos estágios iniciais de formação de biofilmes, nos quais a disponibilidade de oxigênio é maior (Moraes et al., 2014). Pouco se sabe entretanto, como o eDNA se liga à superfície bacteriana, mas este processo parece envolver polissacarídeos extracelulares (Liao et al., 2014; Okshevsky e Meyer, 2015).

Em *Neisseria meningitidis*, a ligação bacteriana a eDNA envolve o alfa-peptídeo da IgA1 protease, sendo que a inativação do gene que codifica esta proteína reduz significativamente a formação de biofilmes dependente de eDNA (Arenas et al., 2013). A região do alfa-peptídeo da IgA1 protease produzida por *N. meningitidis* é pouco conservada na IgA1 protease de *S. sanguinis*. Entretanto, recentemente foi observado que os genes que codificam IgA1 protease (*iga*) e SpxB (*spxB*; requerido para a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e eDNA) são regulados simultaneamente por um TCS envolvido na formação de biofilmes por *S. sanguinis* dependente da produção de eDNA, o TCS SptRS (Camargo et al., 2018). Foi averiguado ainda que cepas defectivas neste sistema SptRS, apresentavam susceptibilidade aumentada à deposição de C3b e do complexo de ataque à membrana (CAM) do sistema complemento. Os efeitos da ligação e recobrimento bacteriano com eDNA no escape a fatores de defesa do hospedeiro ainda são pouco conhecidos. Em *Staphylococcus aureus*, foi demonstrado que a formação de biofilmes contendo eDNA reduz a ativação de macrófagos (Thurlow et al., 2011). Em *Staphylococcus epidermidis*, foi demonstrada que a formação de biofilmes previne a deposição de C3b do complemento e a função de PMN, contribuindo para a persistência de biofilmes (Kristian et al., 2008). O eDNA também quela

peptídeos antimicrobianos (PAM) e cátions divalentes como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , os quais são necessários para a ativação do sistema complemento (Merchant et al., 2005; Lewenza et al., 2013). Em *Haemophilus influenzae*, observou-se que a liberação de eDNA promove escape a beta-defensinas, PAM produzidos nas mucosas, os quais são ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Jones et al., 2013). Portanto, é provável que a interação de *S. sanguinis* com eDNA seja importante para seu escape ao sistema complemento e/ou outros componentes da imunidade inata presente na saliva e no sangue.

### **2.3 Funções do sistema complemento na proteção dos tecidos bucais e no controle de bacteremias**

O sistema complemento é um dos principais componentes da imunidade responsável pela eliminação de microrganismos da corrente sanguínea através da opsonização, além de liberar mediadores quimiotáticos e inflamatórios e induzir a resposta adaptativa humoral (Walport, 2001; Zipfel e Skerka, 2009). Este sistema é constituído de aproximadamente 30 proteínas solúveis, proteínas de membrana reguladoras e receptores presentes em fagócitos, hemácias, plaquetas e diversas outras células (Zipfel e Skerka, 2009). Suas funções antimicrobianas envolvem cascatas proteolíticas que geram fatores opsonizantes (C3b/iC3b, C4b) que se ligam covalentemente à superfície microbiana, proteínas efetoras de ataque às membranas (C5 a C9), fatores quimiotáticos e inflamatórios (C3a, C4a, C5a) (Walport, 2001). A deposição das opsoninas C3b/iC3b sobre microrganismos, não apenas favorece a fagocitose, mas também a remoção de agregados bacterianos em complexos imunes pelas hemácias, as quais expressam receptores CR1 para C3b (Walport, 2001). O sistema complemento também controla microrganismos dos biofilmes dentários, embora suas funções efetoras tenham sido mais intensamente estudadas em relação a patógenos periodontais, os quais se concentram em sítios do sulco gengival onde há maior exposição ao soro que transuda do epitélio gengival (conhecido como fluido crevicular gengival) (Huynh et al., 2015).

Há três principais formas de ativação das cascatas proteolíticas do complemento, a via clássica, a via da lectina e a via alternativa. Diferentes proteínas iniciais estão envolvidas na via clássica (proteínas do complexo C1, C4 e C2), na via da lectina (MBL, C4, C2) e na via alternativa (C3, fator B e D). Resumidamente, a via clássica é

ativada pela ligação do complexo C1 (C1q; C1r, C1s) à parte efetora de anticorpos IgG, IgM ou a outras pentraxinas de fase aguda (CRP, SAP ou PTX3) ligados à superfície bacteriana. A via da lectina independe do reconhecimento bacteriano por anticorpos e inicia-se com o reconhecimento de grupos de manose da superfície bacteriana pela proteína MBL (*mannose-binding lectin*) ou ficolinas (Matsushita, 2009; Zipfel e Skerka, 2009). Finalmente, a via alternativa, é ativada pela hidrólise espontânea C3 gerando componentes semelhantes à C3b, C3(H<sub>2</sub>O), os quais se ligam ao fator B (FB) do complemento formando o complexo C3(H<sub>2</sub>O)FB. Este complexo é então recrutado para superfícies microbianas pela properdina e convertido numa convertase de C3 através da clivagem da porção do FB pelo fator D (Zipfel e Skerka, 2009). Cada uma destas vias é ativada com maior ou menor eficiência de forma espécie-específica, dependendo da afinidade entre as proteínas de conhecimento e os seus alvos bacterianos (Yuste et al., 2006; Yuste et al., 2008). As espécies de estreptococos do grupo viridans, incluindo-se *S. sanguinis* e *S. gordonii*, não apresentam a fosforilcolina (PCo), molécula reconhecida pela pentraxina CRP, o que é compatível com nossos estudos indicando níveis irrelevantes de CRP ligados às cepas de *S. sanguinis* incluídas neste projeto após o tratamento com soro (Alves et al., 2019). Por outro lado, a capacidade de *S. sanguinis* de liberar DNA para o meio extracelular (eDNA) poderia influenciar na sua ligação de outras pentraxinas do hospedeiro, como SAP (de *serum amyloid P component*). Uma importante função fisiológica de SAP é a de se ligar ao DNA liberado de células em processo de apoptose ou necrose, inibindo sua degradação e inibindo respostas imunológicas contra a cromatina do hospedeiro (Noursadeghi et al., 2000). Contudo, não se sabe se SAP é capaz de se ligar a DNA genômico de microrganismos como *S. sanguinis*. A geração das enzimas convertases de C3 das vias clássica/lectina (convertase C4b2b) ou alternativa (convertase C3bBb) promovem a clivagem de C3 para a ligação covalente do fragmento C3b ativo ou inativo (iC3b) à parede celular bacteriana, sendo que estas duas vias podem ser amplificadas pela via alternativa. C3b/iC3b atuam então como opsoninas, favorecendo o rápido reconhecimento destas bactérias por PMN, através dos seus receptores CR1 e CR3. Os fagócitos são também atraídos pelos fragmentos quimiotáticos como C3a e C4a, liberados no sítio infectado (Walport, 2001; Lambris et al., 2008). As convertases de C3 se ligam ainda a moléculas C3b para formar as convertases de C5, o que promove a hidrólise de C5, dando continuidade à cascata, o que resulta na formação dos complexos de ataque à membrana (CAM). O CAM está envolvido não somente na lise de microrganismos Gram-negativos,

mas parece potencializar a ação de peptídeos antimicrobianos dos fluídos do hospedeiro contra bactérias Gram-positivas (Berends et al., 2013; Camargo et al., 2018).

Poucos estudos investigam papel do sistema complemento no controle de microrganismos que colonizam as superfícies supra-gengivais, as quais são mais intensamente expostas à saliva. No entanto, há evidências da importante função das proteínas do complemento presentes na saliva total de indivíduos saudáveis (Andoh et al., 1997). Portanto, é muito provável que a espécie *S. sanguinis*, a qual é abundante e pioneira na colonização de superfícies dentárias banhadas pela saliva e/ou fluído gengival sob condições de homeostase, apresente mecanismos intrínsecos para resistir a funções antimicrobianas do sistema complemento, e que estes mecanismos contribuam para a capacidade desta espécie não só de persistir nos sítios dentários, como de resistir a fatores de defesa do sangue, após seu acesso à corrente sanguínea.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi investigar papel de exopolissacarídeos sintetizados a partir da sacarose e da produção de eDNA no escape de *Streptococcus sanguinis* ao sistema complemento. Para isto, os objetivos específicos deste estudo foram:

- a. Construir mutantes isogênicos de *spxB*, *gtfP* e *iga* a partir da cepa *S. sanguinis* SK36.
- b. Comparar a produção de EPS derivados da sacarose e de eDNA entre as mutantes isogênicas e a cepa parental SK36 sob diferentes condições de cultivo.
- c. Comparar os mutantes isogênicos de *spxB*, *gtfP* e *iga* com a cepa parental SK36, quanto à susceptibilidade à deposição de C3b e à opsonofagocitose por PMN isolados de sangue humano, sob condições que favoreçam a produção de EPS e/ou de eDNA.
- d. Confirmar se as alterações nos fenótipos de deposição do complemento e opsonofagocitose, eventualmente observadas nas mutantes isogênicas, poderão ser restauradas com a complementação dos mutantes com cópia episomal dos genes inativados.
- e. Avaliar o efeito da produção de EPS derivados da sacarose entre cepas selvagens isoladas da cavidade bucal e da corrente sanguínea na deposição de C3b e à opsonofagocitose por PMN, através de análises comparativas de cepas crescidas na ausência ou presença de sacarose.
- f. Determinar o efeito tratamento de células de *S. sanguinis* SK36 com DNase I (para remoção do eDNA) na deposição de C3b e à opsonofagocitose por PMN.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas e condições de cultivo

As cepas incluídas neste estudo estão listadas na Tabela 1 e incluem a cepa referência SK36, duas cepas de *S. sanguinis* isoladas de pacientes com bacteremia (SK1056, SK678) e três cepas isoladas de biofilmes dentários (SK160, SK330, SK353), as quais foram gentilmente cedidas pelo Dr. Mogens Kilian (*Institute of Medical Microbiology and Immunology*, Aarhus University, Aarhus, Dinamarca) e cujos genomas estão em fase de anotação (GenBank). As cepas foram mantidas a -70 °C e reativadas a partir dos estoques congelados em agar *Brain Heart Infusion* (BHA) (Merck Labs, Alemanha). Após o crescimento (24 h; 37°C; 10 % CO<sub>2</sub>), colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck Labs) ou meio quimicamente definido (MQD) livre de sacarose (Camargo et al., 2018) e incubadas sob as mesmas condições durante 18 h. As cepas mutantes foram propagadas em meio acrescido de eritromicina (5 µg/mL) e as cepas complementadas em meio acrescido de espectinomicina (200 µg/mL). Para os ensaios de deposição de C3b e opsonofagocitose, as cepas foram crescidas em meios MQD, MQDS e BHI. O meio THB suplementado com soro de cavalo inativado a 20% (v/v) foi utilizado para estimular a competência natural da cepa SK36.

<b>Cepas</b>	<b>Sítio de isolamento e/ou características relevantes</b>	<b>Referência ou fonte</b>
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>		
UA159**‡	Cavidade bucal de criança cárie ativa	Ajdic et al., 2001
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>		
SK36**‡	Biofilme dental	Xu et al., 2007
SK160*†	Biofilme dental	Kilian et al., 1989
SK330*†	Cavidade bucal	Bishop et al., 2009
SK353*†	Cavidade bucal	Bishop et al., 2009
SK678*†	Sangue	Bishop et al., 2009
SK1056*†	Sangue	Bishop et al., 2009
<b>Mutantes</b>		
SKspxB	$\Delta spxB::Erm^r$	Construída neste estudo
SKgtfP	$\Delta gtfP::Erm^r$	Construída neste estudo
SKiga	$\Delta iga::Erm^r$	Construída neste estudo
<b>Complementados</b>		
SKspxB+	$\Delta spxB::Erm^r$ ; pDL278:: <i>SSA_0391</i> ; <i>Spec^r</i>	Construída nesse estudo
SKgtfP+	$\Delta gtfP::Erm^r$ ; pDL278:: <i>SSA_0613</i> ; <i>Spec^r</i>	Construída nesse estudo
SKiga+	$\Delta iga::Erm^r$ ; pDL278:: <i>SSA_1006</i> ; <i>Spec^r</i>	Em construção

Tabela 1 - Cepas de estreptococos incluídas neste estudo

\* Cepas com genoma em processo de sequenciamento (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)

\*\* Cepa com genoma completo sequenciado. † Gentilmente cedida por Dr. Mogens Kilian, Universidade de Aarhus, Dinamarca. ‡ *American Type Culture Collection* (ATCC).

## 4.2 Amostras de soro

Amostras de soro utilizadas como fonte de proteínas do complemento foram obtidas de um voluntário saudável (LAA). A seleção dos voluntários e a coleta das amostras foram realizadas segundo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, seguida da aprovação do CONEP sob número CAAE: 83140418.0.0000.5418. Resumidamente, amostras de 10 mL de sangue foram coletadas assepticamente em tubos sem anticoagulante, os quais foram submetidos a centrifugação (2.500 rpm, 10 min, 25 °C) para coleta do soro (fase líquida superior). As amostras de soro foram transferidas para criotubos, os quais foram estocados a -70 °C em caixas identificadas em um biorrepositório de soro humano, conforme definido no processo do CEP/CONEP.

## 4.3 Construção dos mutantes *knockout* dos genes *spxB*, *gtfP* e *iga* em *S. sanguinis*

Mutantes isogênicos de *spxB*, *gtfP* e *iga* foram obtidos a partir da cepa referência SK36, utilizando-se de recombinação homóloga com os respectivos alelos mutados, os quais foram construídos através de estratégia de PCR e ligação, como descrito em estudos anteriores (Moraes et al., 2014), com algumas modificações. Nos alelos de DNA recombinante, as sequências codificadoras dos genes foram substituídas pelo gene de resistência à eritromicina obtido do plasmídeo pVA838 (*erm<sup>r</sup>*). Para a confecção dos alelos mutados, o DNA genômico de SK36 foi purificado a partir de 15 mL de cultura em BHI. O DNA plasmidial foi purificado de culturas de *E. coli* contendo pVA838, através de extração alcalina e tratamento com fenol-clorofórmio. As reações de PCR foram realizadas com TaqDNA polimerase de alta fidelidade com atividade *proof reading* (Taq DNA Polymerase High Fidelity, Thermo Fisher Scientific, EUA). A qualidade das reações e tamanhos de fragmentos esperados foram monitorados em géis de agarose a 1,2 % corados com solução de brometo de etídio a 0,15 µg/mL. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se StrataPrep PCR Purification Kit (Stratagene, E.U.A.), segundo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, as regiões que flanqueiam *spxB*, *iga* ou *gtfP* do genoma de SK36 foram amplificadas com pares de primers específicos descritos na Tabela 2 (designados P1-P2 e P3-P4). Os primers P2 e P3 contêm na sua extremidade 5', as

sequências dos sítios de restrição das endonucleases AscI e XhoI, respectivamente. Amplicons com o gene *erm<sup>r</sup>* foram obtidos a partir de pVA838 em reações de PCR com primers E1 e E2, os quais apresentam nas extremidades 5', os sítios de restrição de AscI e XhoI, respectivamente.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na construção dos mutantes dos genes *spxB* (*ssa.0391*), *gtfP* (*ssa.0613*) e *iga* (*ssa.1106*).

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3' (Forward//Reverse) <sup>a</sup>	Tamanho (pb)/ T <sub>m</sub>
<b>Mutantes</b>		
ermE1-ascI	<u>TTGGCGCGCC</u> TTGGCGGAAACGTAAAAGAAG	979 pb/ 58°C
ermE2-xhoI	TTCTCGAGGGCTCCTTGGAAGCTGTCAGT	
SSA_0391P1	<u>CGATCTCTACGATGCTTTTC</u>	503 pb/ 56°C
SSA_0391P2-AscI	TTGGCGCGCGTATCTACGCCCCATGTTTT	
SSA_0391P3-XhoI	TTCTCGAGCTTGGAAGAAGAAGGATTGC	549 pb/ 56°C
SSA_0391P4	<u>ACGCATCCTATTTCATTCG</u>	
SSA_0613P1	<u>CGTTATGAACTCTGGCTCTT</u>	564 pb/ 58°C
SSA_0613P2-AscI	TTGGCGCGCCAGTCACACCGATGGCTACC	
SSA_0613P3-XhoI	TTCTCGAGATGGTAGAGGCAGACGCTTC	542 pb/ 58°C
SSA_0613P4	CCCAACGATTACTTTAGCCG	
SSA_1106P1	<u>CAAGAAAGTCGGCGTTATC</u>	577 pb/ 58°C
SSA_1106P2-AscI	TTGGCGCGGTCAACCCCAACGATAGAA	
SSA_1106P3-XhoI	TTCTCGAGGAAGCCGTTCTCAAAGATGC	599 pb/ 58°C
SSA_1106P4	AAGATTGCCGCAACAAAGTC	
<b>Complementadas</b>		
SSA_0391C1-PvuI	TTGCGATCGGATCTCTACGATGCTTTTC	2.319pb/ 56°C
SSA_0391C2-EcoRI	TTGAATTCTCCGCTCTAAGAAAATCAAG	
SSA_0613C1-PvuI	TTCGATCGCGTTATGAACTCTGGCTCTT	5.387 pb/ 56°C
SSA_0613C2-BamHI	TTGGATCCGTGTGATTGCTCTGCTCCTA	
SSA_1106C1-PvuI	TTCGATCGAAAGTCGGCGTTATCAAAG	6.280 pb/ 56°C
SSA_1106C2-SphI	TTGCATGCGACTGTCAGCAGCAAACCTTC	

<sup>a</sup>As sequências sombreadas correspondem aos sítios de restrição inseridos em cada primer. Sublinhado, encontram-se as sequências homólogas ao genoma de *S. sanguinis*. T<sub>m</sub>; temperatura de anelamento do primer.

Os amplicons obtidos com os pares de primers P1/P2, P3/P4 e E1/E2 foram purificados e digeridos com as endonucleases *AscI*, *XhoI* e *AscI/XhoI*, respectivamente (Figura 1) (New England BioLabs, EUA). Os produtos digeridos foram purificados e ligados utilizando-se a enzima DNA ligase T4 (Thermo Fisher Scientific), segundo as recomendações do fabricante. Os fragmentos ligados foram utilizados como DNA molde das reações de PCR com primers P1/E2 e E1/P4, para gerar múltiplas cópias dos fragmentos P1/E2 e E1/P4 (Figura 2). Após a obtenção dos produtos ligados purificados, 0,5 µl de cada ligado P1/E2 e E1/P4 foi utilizado como DNA molde das reações de PCR com primers P1/P4, para gerar múltiplas cópias dos fragmentos P1-ermR-P4 (Figura 3).

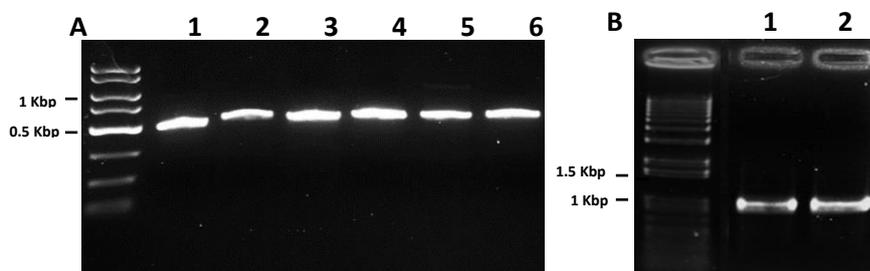


Figura 1 - Gel de Agarose (1%) contendo 10 µl dos produtos de PCR P1-P2 e P3-P4 utilizados para construção dos mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga. A) Produtos de PCR amplificados, purificados e digeridos utilizados na construção dos mutantes. As canaletas 1, 3 e 5 correspondem, respectivamente, aos produtos P1/P2 dos mutantes SKspxB (503 pb), SKgtfP (564 pb) e SKiga (577 pb) digeridos com a enzima de restrição *AscI*; As canaletas 2, 4 e 6 correspondem, respectivamente, aos produtos P3/P4 dos mutantes SKspxB (549 pb), SKgtfP (542 pb) e SKiga (599 pb), digeridos com a enzima de restrição *XhoI*. B) Produtos de PCR E1/E2 (Erm) amplificados a partir do pVA838 (979 pb), purificados e digeridos. Canaleta 1 e 2: produtos E1/E2 digeridos com as enzimas de restrição *AscI* e *XhoI*, respectivamente.

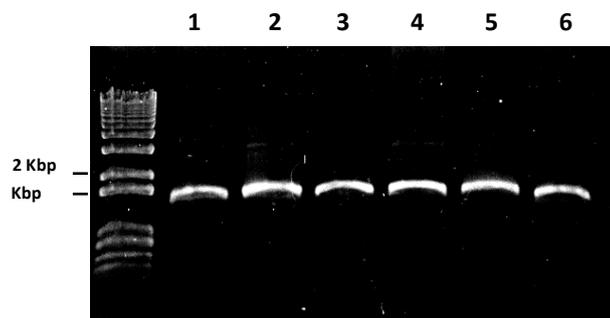


Figura 2 - Gel de agarose (1%) contendo 10 µl de reações de PCR para amplificação dos fragmentos digeridos e ligados P1/E2 e E1/P4 utilizados para construção dos mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga. As canaletas 1 e 2 correspondem, respectivamente, aos produtos obtidos a partir dos fragmentos ligados P1/E2 (1.482 bp) e E1/P4 (1.529 bp) utilizados na construção do mutante SKspxB; as canaletas 3 e 4 correspondem, respectivamente, aos produtos dos fragmentos ligados P1/E2 (1.543 bp) e E1/P4 (1521 bp) utilizados na construção do mutante SKgtfP; as canaletas 5 e 6 correspondem, respectivamente, aos produtos ligados P1/E2 (1.556 bp) e E1/P4 (1.578 bp) utilizados na construção do mutante SKiga.

Para obtenção das cepas mutantes, o total de 10 µg dos fragmentos recombinantes de cada gene alvo purificado (Figura 3C), foi utilizado para transformação natural da cepa SK36, como descrito anteriormente (Moraes et al., 2014). Os transformantes foram recuperados em culturas em agar BHIerm (10 µg/mL). A inativação dos genes *spxB*, *gtfP* e *iga* nos transformantes isolados foi confirmada por reações de PCR com os pares de primers P1/E2, E1/P4 (Figura 4). Os mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga foram cultivados e estocados a -70 °C e a -20 °C em *Skim milk* (Difco Labs).

Para gerar as cepas complementadas (controles), os mutantes isogênicos foram transformados com plasmídeo pDL278 contendo cópia intacta de seus respectivos genes inativados com suas regiões promotoras. Para isso, os genes *spxB* (*ssa.0391*), *gtfP* (*ssa.0613*) e *iga* (*ssa.1106*) foram amplificados com os primers C1/C2 (Tabela 2) a partir do DNA cromossomal da cepa selvagem SK36. Os primers C1/C2 de cada gene contêm nas suas extremidades 5', as sequências dos sítios de restrição específicos para clonagem

no plasmídeo pDL278. Os produtos C1/C2 e o plasmídeo pDL278 foram submetidos separadamente a digestão dupla com enzimas as restrições adequadas para cada amplicon C1/C2 (2 h, 37°C; 10 min. - 65°C). Os fragmentos C1/C2 e o pDL278 digeridos foram purificados (Kit QIAquick PCR Purification – Qiagen) (Figura 5) e ligados com DNA ligase T4 (Invitrogen) (16 h - 14°C; 10 min. - 65°C).

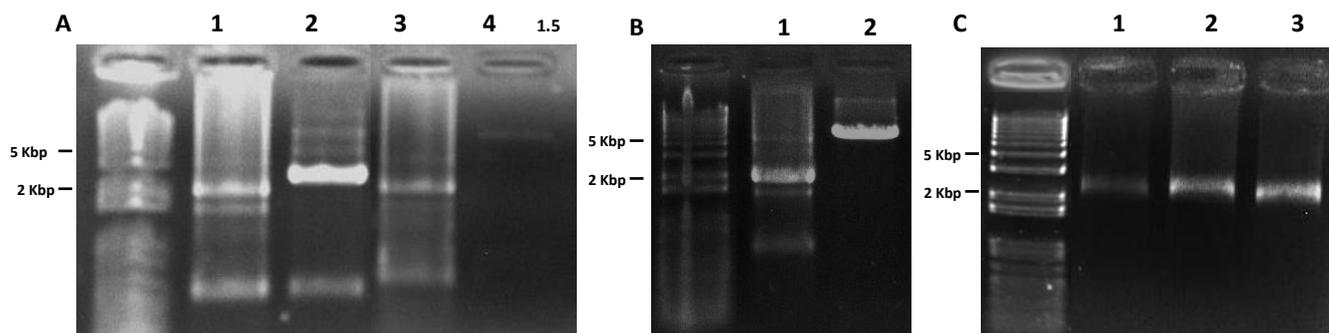


Figura 3 - Gel de agarose (1%) contendo 10 µl de produtos de PCR amplificados com o par de primers P1/P4 utilizados na construção dos mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga. A) Canaleta 1: P1/P4-*spxB* recombinante (2.034 pb) amplificado a partir dos fragmentos ligados P1/E2+E1/P4-*spxB*; canaleta 2: P1/P4-*spxB* amplificado a partir do DNA genômico da cepa selvagem SK36 (2.734 pb) sem Erm; canaleta 3: P1/P4-*gtfP* recombinante (2.085 pb) amplificado a partir dos fragmentos ligados P1/E2+E1/P4-*gtfP*; canaleta 4: P1/P4-*gtfP* amplificado a partir do DNA genômico da cepa selvagem SK36 (5.712 pb) sem Erm. B) Canaleta 1: P1/P4-*iga* recombinante (2.155 pb) amplificado a partir dos fragmentos ligados P1/E2+E1/P4-*iga*; canaleta 2: P1/P4-*iga* amplificado a partir do DNA genômico da cepa selvagem SK36 (6.528 pb) sem Erm. C) Produto P1/P4 recombinante purificado do gel e utilizado para transformação da cepa SK36 para obtenção dos mutantes SKspxB (canaleta 1), SKgtfP (canaleta 2) e SKiga (canaleta 3).

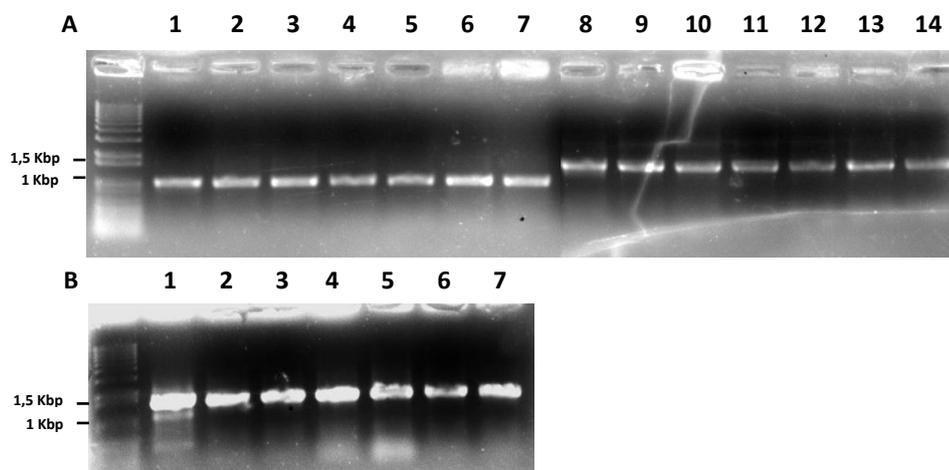


Figura 4 - Confirmação por PCR dos mutantes utilizando-se pares de primers E1/E2, P1/E2 e E1/P4 dos transformantes recuperados em meio acrescido de eritromicina, para obtenção dos mutantes SKspxB SKgtfP e SKiga. A) Produtos de PCR E1/E2 obtidos a partir do DNA cromossomal de dois transformantes de *ssa\_spxB* (canaletas 2 e 3), dois transformantes de *ssa\_gtgP* (canaletas 4 e 5) e dois transformantes de *ssa\_iga* (canaletas 6 e 7); as canaletas 1 e 8: controles positivos obtidos a partir do plasmídeo pVA838 e do produto ligado P1/E2, respectivamente. O DNA cromossomal dos mesmos clones foram utilizados para amplificar o produto P1/E2. Canaletas 9 e 10: transformantes de *ssa\_spxB*; canaletas 11 e 12: transformantes de *ssa\_gtgP*; canaletas 13 e 14: transformantes de *ssa\_iga*. B) DNA cromossomal dos clones selecionados foram utilizados como molde para uma reação de PCR para amplificação dos fragmentos E1/P4. Canaletas 2 e 3: transformantes *ssa\_spxB*; canaletas 4 e 5: transformantes *ssa\_gtgP*; canaletas 6 e 7: transformantes *ssa\_iga*; canaleta 1: controle positivo obtido a partir do produto ligado E1/ P4.

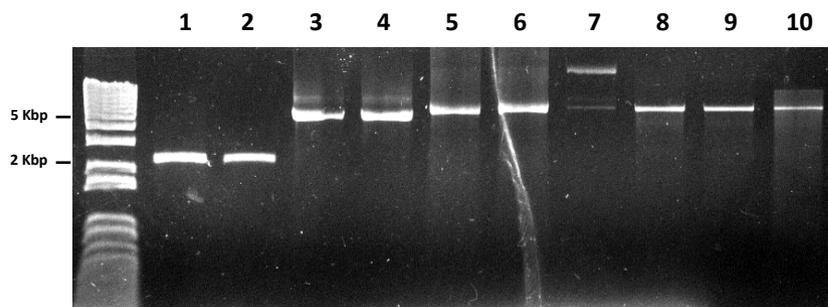


Figura 5 - Produto de PCR e plasmídeo pDL278 utilizados para construção das cepas complementadas SKspxB+, SKgtfP+ e SKiga+. Canaletas 1 e 2: Produto de PCR com primers C1/C2 *-spxB* (2.319 pb) amplificado a partir do DNA genômico da cepa SK36; canaleta 1: produto não digerido; canaleta 2: produto submetido a digestão dupla com as enzimas PvuI e EcoRI. Canaletas 3 e 4: Produto C1/C2 *-gtfP* (5.387 pb) amplificado a partir do DNA genômico da cepa SK36; canaleta 3: produto não digerido; canaleta 4: produto após digestão dupla com as enzimas PvuI e BamHI. Canaletas 5 e 6: produtos C1/C2 *-iga* (2.319 pb) amplificado a partir do DNA genômico da cepa SK36 antes e após digestão dupla com as enzimas PvuI e SphI, respectivamente. Canaleta 7: pDL278 não digerido. Canaletas 8, 9 e 10: pDL278 linearizado após digestão dupla com os pares de enzimas PvuI-EcoRI (canaleta 8), PvuI-BamHI (canaleta 9) e PvuI-SphI, respectivamente.

#### 4.4 Construção das cepas complementadas

As mutantes isogênicas SKspxB, SKgtfP e SKiga foram complementadas com cópia episomal dos respectivos genes inativados. Para isso, os genes *spxB* (*ssa.0391*), *gtfP* (*ssa.0613*) ou *iga* (*ssa.1106*) foram amplificados e clonados no plasmídeo pDL278, obtendo-se então plasmídeos contendo cópia intacta dos genes inativados. Os três plasmídeos para complementação foram então transformados nas respectivas cepas mutantes. Diversos transformantes obtidos foram então recuperados em ágar BHI suplementando com espectinomicina (500 µg/mL), foram isolados, e sub-cultivados em BHI com espectinomicina para estoque em glicerol (40% v/v) a -70°C. A complementação da cepa SKspxB foi confirmada através da restauração do fenótipo de produção H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de eDNA. Para isso, as cepas SK36, SKgtfP e os clones possivelmente complementados foram crescidos em meio BHI (suplementado com espectinomicina na concentração de 500

$\mu\text{g/mL}$ ) sob aerobiose até o final da fase de crescimento exponencial ( $A_{550\text{nm}}$  0,7), as culturas foram centrifugadas (duas vezes, 16.000 x g, 5 minutos, 4 °C), para obtenção dos sobrenadantes utilizados para quantificar a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e eDNA. Para mensurar a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 40  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para uma placa de microtitulação contendo 160  $\mu\text{L}$  de solução fresca de acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) com 0,1  $\mu\text{g}$  de peroxidase e 10  $\mu\text{L}$  de solução de o-dianisodina (1 mg/mL em metanol). As microplacas foram incubadas no escuro (10 minutos, temperatura ambiente) e a absorbância da reação foi mensurada em um espectrofotômetro ( $A_{570\text{nm}}$ ). A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi calculada utilizando uma curva padrão preparada em BHI (0,29 a 4,68 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O eDNA presente no sobrenadante foi quantificado por qPCR, como descrito no item 5.6. Entre os cinco clones testados, o clone de número 2 foi designado com SKspxB+, sendo utilizado nas análises fenotípicas (Figura 6).

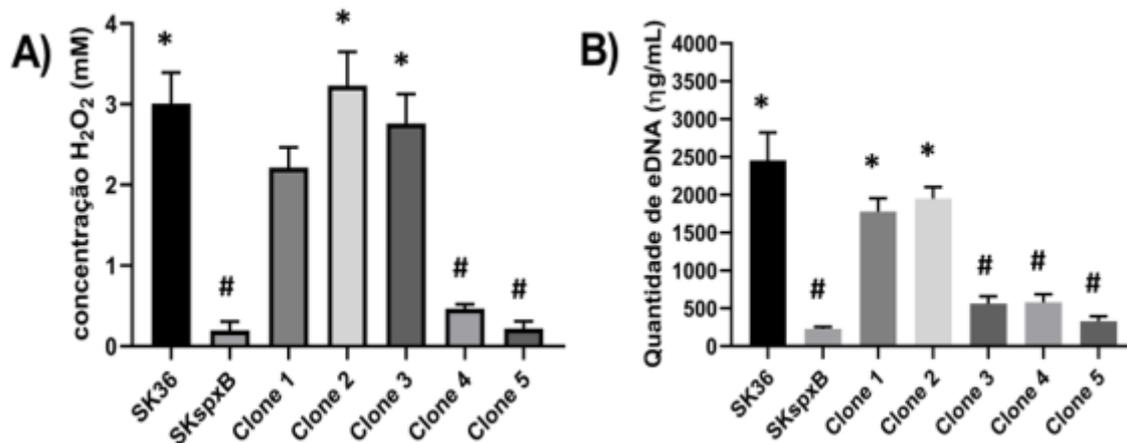


Figura 6 - Confirmação da construção do mutante complementado SKspxB+. Os clones da mutante SKspxB transformados com plasmídeo pDL278::*spxB* foram incubados em meio BHI suplementado com espectinomicina (500 $\mu\text{g/ml}$ ) até atingirem o final da fase de crescimento exponencial ( $A_{550\text{nm}}$  0,7). As células bacterianas foram então removidas destas culturas através de centrifugação e os sobrenadantes filtrados através de membranas de poros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro, para quantificação bioquímica de peróxido de hidrogênio (A) e quantificação de eDNA por qPCR (B). As colunas correspondem a médias de triplicatas obtidas de um experimento independente representativo; as barras correspondem aos desvios padrão. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação à cepa mutante SKspxB. Hashtags indicam diferenças significantes em relação à cepa parental SK36 (Kruskal-Wallis; \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,05$ ).

Os transformantes de SKgtfP transformados com plasmídeo de complementação contendo o gene *gtfP* (pDL278::spxB) foram confirmados através de qPCR, utilizando-se primers para detectar a expressão do gene *gtfP* (Tabela 3). As culturas das cepas SK36, SKgtfP e dos transformantes foram cultivadas em meio BHI com espectinomicina em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub> em ar até o início da fase de crescimento exponencial ( $A_{550nm}$  0,3), conforme descrito no item 4.5. Foram considerados complementados os clones que apresentaram expressão do gene *gtfP*, o qual é ausente na cepa SKgtfP.

#### **4.5 Análise da expressão de genes *spxB*, *gtfP* e *iga* em SK36 nas cepas mutantes e isolados clínicos**

Análises de qPCR foram realizadas para definir os perfis de transcrição de *spxB*, *gtfP* e *iga* nas cepas SK36, SKspxB, SKgtfP e SKiga quando crescidas em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub> e em aerobiose. Para as análises transcricionais, as cepas foram cultivadas como descrito no item 4.1. As células presentes em 20 mL de cultura de cada cepa ao final da fase exponencial de crescimento ( $A_{550nm}$  0,7) (Moraes et al., 2014) foram coletadas por centrifugação, lavadas em PBS (pH: 7,2) e congeladas a -70 °C, para posterior extração de RNA.

Para a extração do RNA total, as células foram lisadas na presença de aproximadamente de 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 pH 8,0), em aparelho Mini-bead beater (Biospec, EUA), sob força máxima (2 ciclos de 30 s cada, com intervalos de 30 s em gelo). A purificação do RNA total foi realizada utilizando-se o Kit *RNeasy MiniKit* (Qiagen, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. O RNA purificado foi tratado com 10 U de Turbo DNase (Invitrogen), para a eliminação total de DNA genômico. A concentração e pureza das amostras foram analisadas através de leitura 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% (com 1,8% de formaldeído), contendo 0,15 µg/mL de brometo de etídio (Fig. 7).

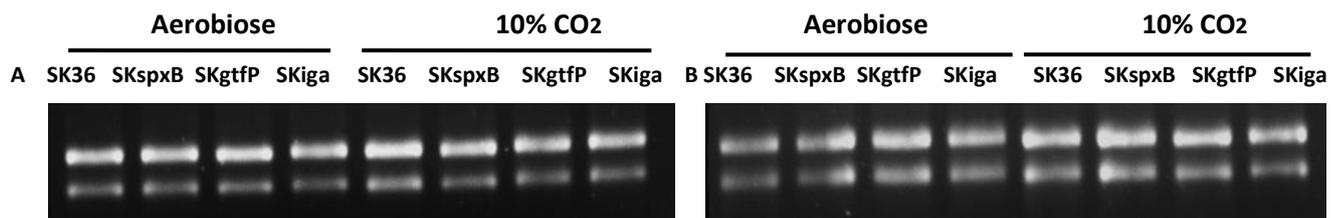


Figura 7 - Gel de agarose (1,2%) mostrando a integridade das amostras de RNA extraído (0,5 µg/canaleta). (A) Amostras de RNA não tratadas. (B) Amostras de RNA depois do tratamento com DNase turbo. As cepas de *S. sanguinis* foram crescidas em meio BHI (aerobiose, 37°C) até a  $A_{550nm}$  0,7, e as células coletadas por centrifugação (5 min, 5.000 x g, 4°C), para posterior extração de RNA.

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 H<sub>2</sub>O DEPC qsp 26 µL. As reações de RT ocorreram em termociclador (Thermoblock T1, Biômetra, Alemanha). Inicialmente as amostras foram aquecidas a 65 °C (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 0,1 M DTT; 2 µL de RNase OUT (40 U/µL) e 2 µL de SuperScript III (200 U/µL). Depois, as reações prosseguiram em termociclador 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 H<sub>2</sub>O DEPC.

As reações de qPCR ocorreram 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, as quais foram submetidas à ciclagem térmica em sistema de PCR quantitativo StepOne (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 *16SRNA<sub>r</sub>* foi utilizado como gene referência, o qual se mostrou invariável entre as condições utilizadas. Os primers utilizados nas análises de qPCR estão listados na Tabela 3 e foram desenhados para cada um dos genes testados, para amplificar produtos de 120 a 250 pb sob temperaturas de *melting* entre 52 e 58 °C.

Tabela 3 - *Primers* utilizados nas reações de qPCR.

<i>Primers</i> qPCR	Sequência 5'-3' (Forward//Reverse)	Tamanho (pb)	Fonte/referência
<i>16SRNA<sub>r</sub></i>	CGTAAACGATGAGTGCTAGGTG/ TAGAGCGGTCAGAGGGATGT	204	Moraes et al., 2014
SSA_0391 <i>spxB</i>	ACTTATTTCCCCTTTGGTGTG/ ATCCTTGATTTTCCTCTTCTGC	204	Camargo et al., 2018
SSA_0613 <i>gtfP</i>	TCAAGGAGAGAAAGGCTATGC/ AGCTTCATTGGCATTAGGTACA	196	Camargo et al., 2018
SSA_1106 <i>iga</i>	ACTATTAGGGCTTGGGATGC/ CCTCTACCGCATTTTTCTCA	160	Camargo <i>et al.</i> , 2018
<i>16SRNA<sub>r c</sub></i>	GGGTGTCATGGCTAGAGG/ CAACACCATCTGCTCCGA	198	Este estudo
<i>gtfP c</i>	GGAAACTGTTTAACTTGAGTGC/ GGCCTAACACCTAGCACTCA	202	Este estudo

#### 4.6 Quantificação do eDNA

Os ensaios para quantificação de eDNA por qPCR foram realizados como descrito em nossos estudos anteriores (Moraes et al., 2014; Camargo et al., 2018). Resumidamente, foram coletados os sobrenadantes das culturas bacterianas, os quais foram filtrados (em filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro), para remoção de células remanescentes. Foram realizadas reações de qPCR com amostras de 1 µL dos sobrenadantes filtrados, acrescidas de 3,5 µL de água livre de DNase, 5 µL de Power SYBR-Green PCR Master Mix (Life Technologies, USA) e 0,3 µL de solução estoque (10 mM) de cada primer para o gene *16SRNA<sub>r</sub>*. Estas amostras foram submetidas à ciclagem térmica em sistema de PCR quantitativo StepOne (Life Technologies). O ciclo térmico de

amplificação consiste na desnaturação inicial a 95 °C (10 min), seguida de 45 ciclagens de desnaturação a 94 °C (15 s), anelamento a 54 °C (15 s) e extensão a 72 °C (30 s). Os ensaios foram realizados em duplicata, a partir de amostras de sobrenadante obtidas em três experimentos independentes. Para cada ensaio, curvas de amplificação de DNA em quantidades crescentes (0,003; 0,03; 0,3; 3, 30 e 300 ng/poço) foram realizadas.

#### **4.7 Determinação da produção de EPS solúveis e insolúveis**

Determinamos a produção de EPS solúveis e insolúveis em água, através do método colorimétrico da reação de EPS com ácido sulfúrico e fenol (Dubois et al., 1956), utilizando para isto, precipitados bacterianos de culturas em MQD suplementado com 1% sacarose (MQDS) ou com 1% de glicose (MQD, como controle negativo), segundo estudo realizado por Spinola et al. (2019). Resumidamente, as cepas foram crescidas em meio de cultura MQD e MQDS por 18h (37°C; 10% de CO<sub>2</sub>) a partir de inóculo padronizado de culturas em BHI (A<sub>550nm</sub>: 0,03). As medidas de absorbância das culturas foram então determinadas para monitoramento do crescimento e sonicadas (1 min; 9 V sob banho de gelo) para coleta de amostras para as análises bioquímicas (alíquotas duplicata de 500 ul) e para determinação do número de ufc/mL em ágar BHI (alíquotas de 20 ul para diluição seriada). Para as análises bioquímicas, as amostras foram centrifugadas (1.000 x g, 5 min., 4 °C), e os sobrenadantes contendo a fração de EPS solúveis reservados em microtubos. Os pellets contendo o EPS insolúvel (álcali-solúvel) foram tratados com NaOH (1 M) em temperatura ambiente, sob agitação, por 15 min., para extrair a fração de EPS insolúveis. Ambas as frações foram então precipitadas em três volumes de etanol 70% gelado a -20 °C por 30 min. As mesmas foram então lavadas duas vezes com etanol 70% gelado e secas sob temperatura ambiente por 15 min., para evaporação do etanol residual. Os EPS das amostras foram então quantificados através do método colorimétrico com ácido sulfúrico e fenol (Dubois et al., 1956). Foram utilizados para isto, uma curva padrão de concentrações crescentes de glicose (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; e 400 ug/mL).

#### 4.8 Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A produção de EPS também foi realizada através de análises de MET. Para isso, as cepas foram crescidas por 18h (37 °C; 10% CO<sub>2</sub>) em MQD ou MQDS. A seguir, bactérias separadas por centrifugação de 500 µL de cada cultura, foram lavadas duas vezes com PBS (pH: 7,2) e os precipitados fixados com solução de Karnovsky por 24 h à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram lavadas com tampão de fosfato de Sorensen (0,1 M) e tratados com solução de Tetróxido de ósmio (1%) por 2 h em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram desidratadas seriadamente com soluções de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). As amostras foram gradualmente infiltradas com resina de baixa viscosidade (Dr. Spurr), utilizando proporções crescentes de soluções de acetona e resina (3:1 por 4 h; 1:1 por 18h; 1:3 por 2h; resina pura 1 h) em temperatura ambiente. As amostras foram incubadas a 60 ° C durante 72 h para a polimerização da resina. As amostras foram então cortadas com navalha de diamante (Diatome, Switzerland) em secções de 35-50 nm de espessura, com o auxílio de um micrótomo (EM UC6; Leica Microsystems, Vienna, Austria). Os cortes foram montados em grade de cobre com 200 *mesh* coberta por filme formvar/carbono (EMS, USA) e contrastados com acetato de uranila 2,5% (15 min.) e com citrato de chumbo (5 min.). As grades contendo os cortes foram analisadas pelo microscópio eletrônico de transmissão JEM 1400 (JEOL, Akishima, Tokyo, Japan) operando a uma tensão de aceleração de 80 kV. As imagens digitais foram geradas por um conjunto de câmeras (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

#### 4.9 Análise dos polimorfismos de GtfP das cepas *S. sanguinis*

Os genomas parciais das oito cepas isoladas da cavidade bucal ou da corrente sanguínea, disponíveis no Genbank foram submetidos a análises de bioinformática em cooperação com o Dr. Tsute Chen (coordenador do *Human Oral Microbiome Database - Forsyth Institute*, Cambridge, MA, E.U.A.), para a identificação da presença e/ou de polimorfismos das enzimas GtfP. Para isto, os genomas parciais foram recuperados do GenBank e anotados utilizando-se a ferramenta PROKKA. Os genes *gtfP* foram então identificados por análises de BLAST e as respectivas sequências protéicas foram alinhadas utilizando-se a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

#### 4.10 Tratamento das cepas estudadas com DNAse

Para o tratamento com DNAse, as cepas estudadas foram crescidas em BHI (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 18 h) até atingir o final da fase exponencial de crescimento ( $A_{550nm}$  0,7), as culturas foram diluídas à  $5 \times 10^6$  ufc/mL ( $A_{550nm}$  0,3). As células foram então separadas por centrifugação (10.000 x g, 5 min., 4°C) e lavadas por duas vezes com PBS (pH: 7,2). O precipitado bacteriano foi então re-suspendido em tampão contendo 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 µg/mL DNAase I (DN-25, Sigma) e a suspensão incubada (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) por 45 min., para remoção do eDNA (Das et al., 2010). A seguir, as células foram lavadas duas vezes com PBS para serem utilizadas nos ensaios de deposição do complemento. Como controles negativos da remoção de eDNA, foram utilizadas bactérias das mesmas culturas tratadas apenas com a solução tampão sem DNAase I (Moraes et al., 2014).

#### 4.11 Análises da deposição de C3b/iC3b sobre as cepas estudadas

Os ensaios para analisar a deposição de C3b/iC3b do sistema complemento sobre as cepas *S. sanguinis* foram realizados como descrito anteriormente (Camargo et al., 2018). Para isto, volumes de 140 µl de culturas de cada cepa em MQD ou BHI (18 h, 37 °C, 10% CO<sub>2</sub>), foram transferidos para 5 mL de meio MQD (com e sem adição de 1% de sacarose) e incubadas sob as mesmas condições prévias até atingir a absorbância ( $A_{550nm}$ ) de 0,3, a qual corresponde a aproximadamente  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  ufc/mL. Volumes de 500 µl destas culturas foram centrifugados e as bactérias lavadas em 500 µl de PBS (pH 7,2) por duas vezes. Em seguida, aproximadamente  $10^7$  ufc de células destas suspensões foram separadas por centrifugação, ressuspendidas em soro humano diluído em PBS (pH: 7,2) a 20% e incubadas durante 30 min a 37 °C. Em seguida, as bactérias foram lavadas por duas vezes em PBS-Tween 20 a 0,05% (PBST, pH 7,4), ressuspendidas em 50 µl de solução do anticorpo IgG de cabra anti-C3 humano (ICN, EUA) (1:300 em PBST) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e incubadas em gelo por 40 min. Após a incubação, as bactérias foram lavadas por duas vezes em 300 µl de PBST, centrifugadas (11.200 x g; 2 min., 4°C) e ressuspendidas em 300 µl de PBS (pH: 7,2) com 3% de paraformaldeído, para análise em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), disponível no Departamento de Diagnóstico Oral (FOP-UNICAMP). A intensidade de marcação por C3b/iC3b foi avaliada em pelo menos 25.000 bactérias localizadas no *gate* desenhado

através dos parâmetros de tamanho (FCS-Foward Scatter) e complexidade (SSC-Side Scatter) das células, excluindo-se os debris localizados abaixo de SSC de  $10^1$ . Como controles negativos, foram analisadas bactérias tratadas nas mesmas condições com soro inativado pelo calor ( $56\text{ }^\circ\text{C}$ ). Foram determinadas as porcentagens de bactérias fluorescentes e as médias geométricas de intensidade de fluorescência (MFI) e índice de fluorescência (FI) em relação aos controles negativos.

#### **4.12 Ensaios de opsonofagocitose por PMN isolados de sangue periférico**

Os ensaios de opsonofagocitose das cepas estudadas foram realizados como descrito anteriormente (Alves et al., 2016), com algumas modificações. Para isto, foram utilizados PMNs isolados das amostras de sangue com solução de Histopaque 1119 e 1083TM (Sigma-Aldrich). As amostras utilizadas continham  $>95\%$  de PMN viáveis (analisas pela coloração com azul de Trypan) e pureza superior a  $94\%$ . A pureza das populações celulares foi determinada pela análise das características de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD). Os PMN purificados foram expostos às cepas previamente marcadas com  $1\text{ mg/mL}$  de FITC, como descrito anteriormente (Alves et al., 2016). Para os ensaios de fagocitose, volumes de  $50\text{ }\mu\text{L}$  de suspensão em RPMI (1640, Sigma) das bactérias marcadas contendo  $4 \times 10^7$  bactérias/mL, foram transferidos para placas de 96 poços contendo  $50\text{ }\mu\text{L}$  de  $2 \times 10^5$  PMN/mL de PMN (1.000 PMN por poço) em meio RPMI suplementado com  $10\%$  de soro fetal bovino inativado e sem antibióticos, para atingir uma multiplicidade de infecção (MOI) de 200 bactérias por PMN. As bactérias foram incubadas com os PMNs, na presença de soro a  $20\%$  durante  $5\text{ min}$  ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $10\% \text{ CO}_2$ , sob leve agitação). Bactérias incubadas com PMNs na ausência de soro foram utilizadas como controle negativo. A reação de fagocitose foi paralisada com adição de  $100\text{ }\mu\text{L}$  de PBS (pH: 7,2) gelado e o volume total de cada poço foi transferido para microtubos de  $1,5\text{ mL}$ . Os PMNs foram separados por centrifugação ( $500 \times g$ ,  $8\text{ min.}$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) e lavados por 2 vezes em PBS (pH: 7,2). Em seguida, os PMN foram transferidos para tubos de ensaio ( $12 \times 75\text{ mm}$ ) e fixados com  $300\text{ }\mu\text{L}$  de paraformaldeído a  $1\%$  em PBS e analisados em citômetro de fluxo (FACSCalibur. BD). Para monitorar a influência da fagocitose via opsonização por anticorpos IgG do soro, foram também utilizados PMN com receptores de Fc-IgG (CD32) previamente bloqueados com anticorpos anti-CD32 (eBioscience®), nas mesmas condições descritas acima. A

porcentagem de PMN fluorescentes foi usada como frequência de fagocitose em um total de 10.000 células analisadas (Alves et al., 2016).

#### 4.13 Análise dos resultados

A quantidade de eDNA produzido e as análises de qPCR foram comparadas entre cepas, utilizando-se as médias de dados obtidos em pelo menos três experimentos independentes, através de análises paramétricas de ANOVA com pós-teste de Dunnet. As variações foram consideradas como estatisticamente significantes quando os valores de “p” encontrados foram inferiores a 0,05. O Efeito do eDNA sobre a deposição de C3b foi avaliado utilizando Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn, considerando variações com valor de  $p < 0,05$ . Em relação à influência da inativação de *gtfP* sobre a deposição de C3b foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney U-test \*, #  $p < 0,05$ . O efeito dos EPS derivados da sacarose na deposição de C3b e fagocitose por PMN em cepas *S. sanguinis* foi analisado estatisticamente à partir do cálculo de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. \* ou #:  $p < 0,05$ . Níveis relativos de transcritos de gene *gtfP* nas cepas de isolados de *S. sanguinis* bem como o efeito de inativação do gene *iga* foram utilizados o teste estatístico de Mann-Whitney U-test considerando o valor de “p” menor que 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das cepas mutantes SKgtfP, SKspxB e SKiga e mutantes complementadas

As cepas mutantes obtidas em SK36 foram inicialmente caracterizadas quanto à morfologia celular e curvas de crescimento em diferentes meios de cultura. Como observado na Figura 8, as análises de Gram das culturas de 18 h revelaram uma pequena redução no tamanho das cadeias das cepas SKspxB e SKiga em comparação à cepa parental SK36, assim como redução acentuada no tamanho das cadeias de SKgtfP (Figura 8). Comparações das curvas de crescimento ainda demonstraram maior tempo de geração nas cepas SKgtfP e SKiga em meio complexo BHI, sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 10% em ar (Figura 9A). Houve também redução do crescimento de SKgtfP em MQD (Figura 9B), mas as cepas não diferiram em crescimento em MQD suplementado com 1% de sacarose (Figura 9C). Todas as cepas demonstraram menor crescimento sob maior tensão de oxigênio (aerobiose, sob agitação) (Figura 10). Entretanto, SKgtfP demonstrou menor crescimento do que SK36 em MQD suplementado ou não com sacarose (Figura 10B,C), mas mostrou crescimento maior do que SK36 em meio BHI (Figura 10A).

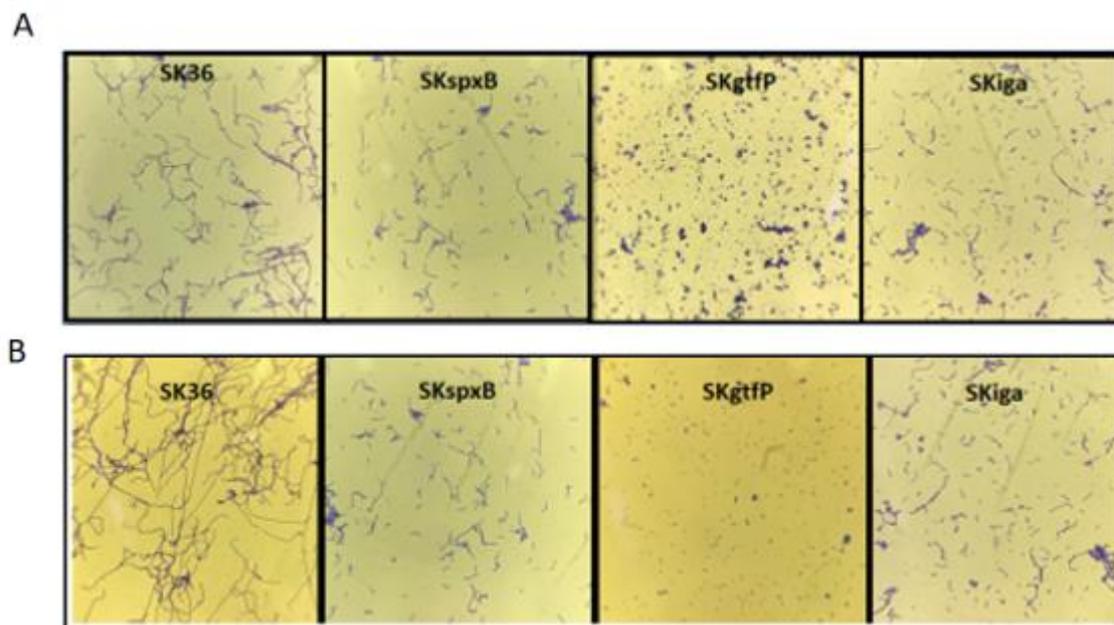


Figura 8 - Análise de Gram das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivas mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga. As cepas foram crescidas em meio BHI (A) e em MQD (B) sob atmosfera aeróbica com 10% de CO<sub>2</sub> durante 18h. A seguir, as culturas foram agitadas para suspensão bacteriana e alíquotas foram transferidas para lâminas de vidro, coradas pelo método de Gram e analisadas por microscopia de luz. As imagens digitais representativas das bactérias coradas foram obtidas sob aumento de 1.000 X.

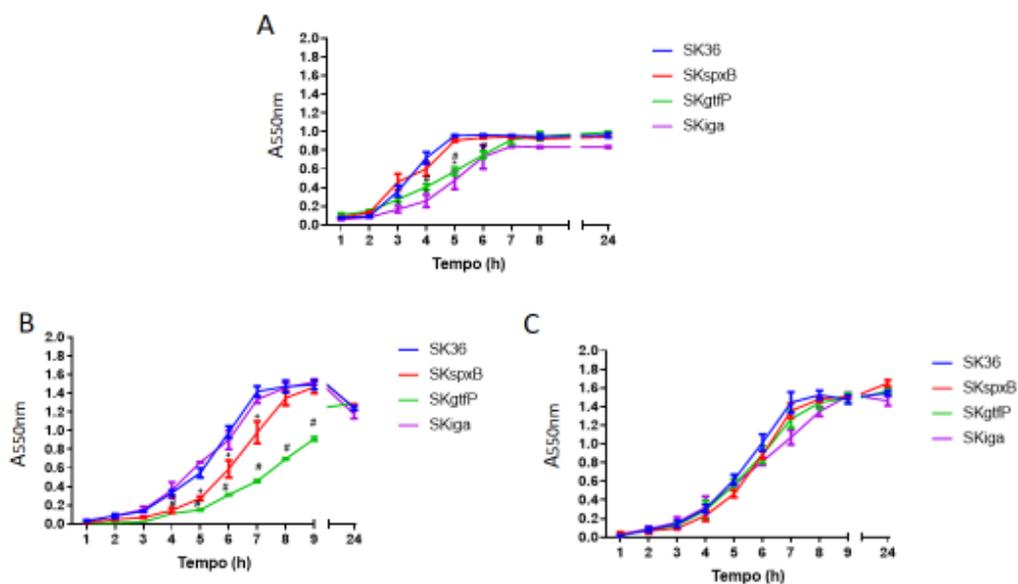


Figura 9 - Crescimento planctônico das cepas de *S. sanguinis* SK36 e respectivas mutantes isogênicas SKspxB, SKgtfP e SKiga em diferentes meios de culturas. As cepas foram crescidas em meio BHI ou MQD por 18h e alíquotas ajustadas pela absorbância foram transferidas para frascos contendo 50 ml meio fresco BHI (A), meio quimicamente definido (MQD) (B) ou MQD suplementado com 1% de sacarose (MQDS) (C). Os frascos foram então incubados em atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> em ar e alíquotas das culturas em suspensão, obtidas para medida das absorbâncias até 24h de incubação. Os valores representam a média de três experimentos diferentes; as barras indicam os desvios padrão.

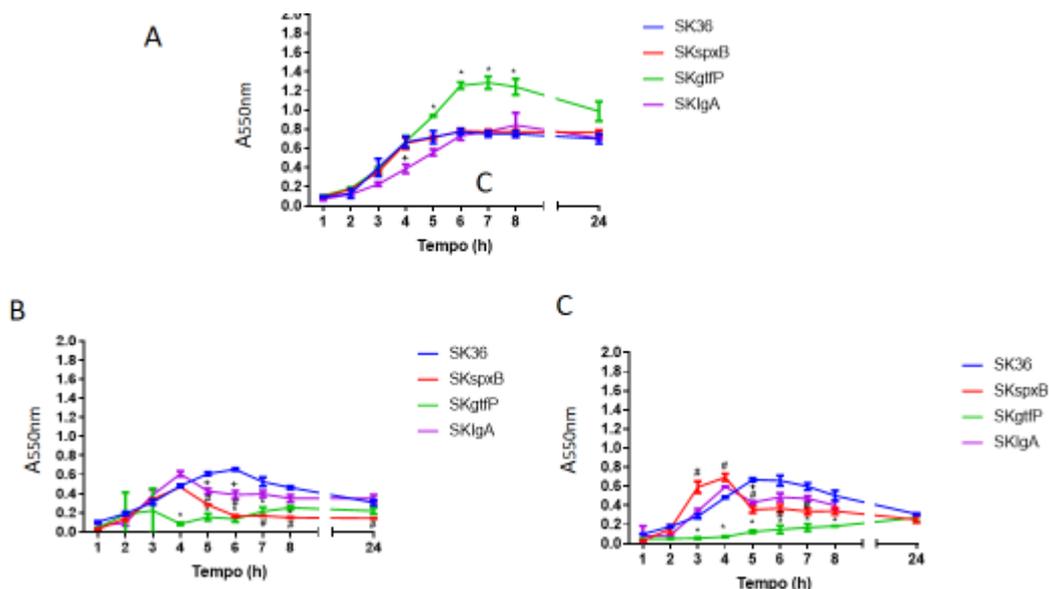


Figura 10 - Crescimento planctônico das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivas mutantes isogênicas SKspxB, SKgtfP e SKiga em diferentes meios de culturas, sob aeração (agitação). As cepas foram crescidas em meio BHI ou MQD por 18h e alíquotas ajustadas pela absorbância foram transferidas para frascos contendo 50 ml meio fresco BHI (A), meio quimicamente definido (MQD) (B) ou MQD suplementado com 1% de sacarose (C). Os frascos foram então incubados sob aerobiose em plataforma agitadora (160 rpm) e alíquotas das culturas em suspensão obtidas para medida das absorbâncias até 24h de incubação. Os valores representam a média de três experimentos diferentes; as barras indicam os desvios padrão.

A seguir, foram avaliados os perfis transcricionais dos genes *spxB*, *gtfP* e *iga* através de análises de RT-qPCR em atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> (90% ar; sem agitação) e em atmosfera de aerobiose sob agitação. Conforme esperado, os mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga, não apresentaram transcritos dos respectivos genes inativados *spxB*, *gtfP* e *iga* em nenhuma das condições (Figura 11). Por outro lado, a mutante SKspxB apresentou expressão significativamente maior de *gtfP* (Figura 11B) e de *iga* (Figura 11C), em comparação à cepa parental. A mutante SKiga apresentou aumento da expressão de *spxB* (Figura 11A), quando cultivada sob aeração, enquanto que a mutante SKgtfP demonstrou ligeiro aumento na expressão de *iga* sob 10% de CO<sub>2</sub>. A expressão de *iga* também foi alterada significativamente nos mutantes SKspxB e SKgtfP em ambas as atmosferas (Figura 11C). Comparações dos níveis de transcritos da mesma cepas entre diferentes condições atmosféricas, revelaram ainda que as alterações na transcrição dos genes *spxB* e *gtfP* foram mais acentuadas sob aeração (Figura 11A,B), enquanto do gene *iga*, sob atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> (Figura 11C). Assim, estes dados indicam uma conexão na

regulação dos genes *spxB*, *gtfP* e *iga*, possivelmente pela importância destes três genes para a persistência de *S. sanguinis* nos diferentes tecidos do hospedeiro.

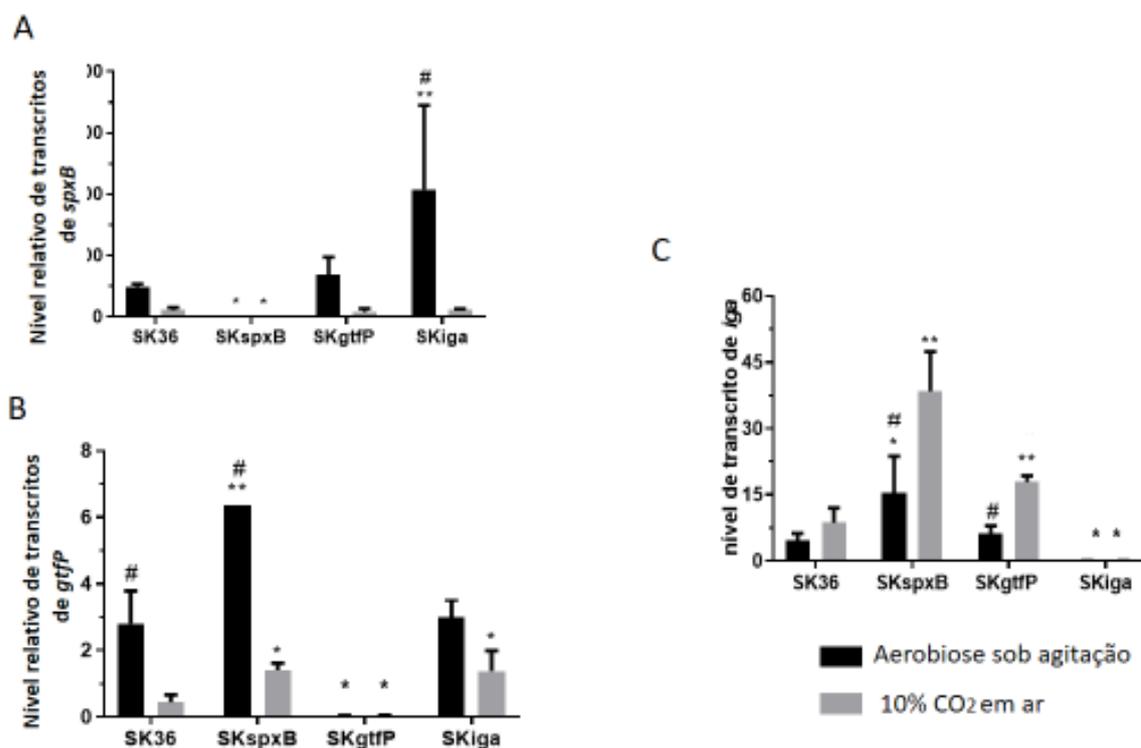


Figura 11 - Níveis de transcritos dos genes *spxB* (A), *gtfP* (B) e *iga* (C) nas cepas de *S. sanguinis* SK36, SKspxB, SKgtfP, SKiga normalizados pelo gene 16SRNAr. As cepas de *S. sanguinis* foram crescidas em meio BHI em condições atmosféricas com 10% de CO<sub>2</sub> e em aerobiose até atingirem o final da fase de crescimento exponencial ( $A_{550nm}$  0,7), as células coletadas por centrifugação e extração de RNA. As colunas representam a média e o erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata, as colunas pretas representam o crescimento em aerobiose e as colunas cinzas crescimento em 10% de CO<sub>2</sub>. Asteriscos indicam diferença significativa entre os níveis de transcritos das cepas mutantes e da cepa parental SK36 na mesma condição de crescimento (\*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$ ). As cruzetas indicam diferença significativa entre os níveis de transcritos da mesma cepa sob atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> em ar (#  $p < 0,001$ ). ( $p < 0,01$  determinado por ANOVA com pós teste de Dunnett).

As cepas também foram caracterizadas quanto à produção de eDNA, o qual foi quantificado nos sobrenadantes das culturas em duas fases de crescimento ( $A_{550nm} = 0,3$  e 0,7) por qPCR. Como mostrado na Figura 12, não houve diferenças significativas entre as cepas quanto à produção de eDNA no início da fase log de crescimento ( $A_{550nm} = 0,3$ ).

Entretanto, ao final da fase de crescimento exponencial, a cepa selvagem SK36 e os mutantes SKgtfP e SKiga liberaram cerca de duas vezes mais eDNA do que a cepa SKspxB ( $p < 0.01$ ), confirmando que SKspxB é defectiva na produção de eDNA e demonstrando que a inativação de *gtfP* ou *iga* não afeta a produção de eDNA em SK36.

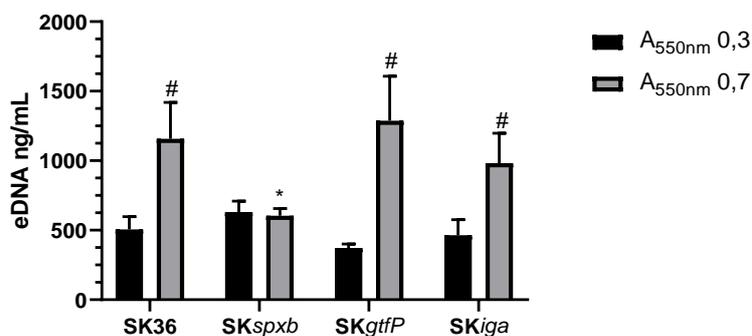


Figura 12 - Quantidades de eDNA em sobrenadantes de cultura planctônica das cepas *S. sanguinis* SK36, SKspxB, SKgtfP e SKiga em diferentes fases de crescimento. As quantidades de eDNA foram determinadas por qPCR em amostras de sobrenadante de cultura em BHI previamente filtrados para remoção das células. As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se primers para o gene 16SRNAr. As colunas e barras representam respectivamente as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa em relação à cepa parental SK36 na mesma condição de crescimento. As cerquilhas representam diferença estatisticamente significativa em relação às culturas da mesma cepa em  $A_{550nm} = 0,3$ . ANOVA com pós-teste de Dunnett:  $p < 0,01$ .

O efeito da inativação de *gtfP* na produção de glucanos solúveis e insolúveis derivados da sacarose também foi analisado. Como mostrado na Figura 13, as quantidades de EPS solúveis foram significativamente menores na mutante SKgtfP do que na cepa SK36 nas culturas em MQDS. Além disso, o fenótipo de produção de EPS solúveis foi completamente restaurado na mutante complementada (SKgtfP+). As quantidades de EPS insolúveis não foram significativamente alteradas na cepa mutante SKgtfP, quando comparadas à SK36 e SKgtfP+. Uma fração destes polissacarídeos insolúveis parece não consistir de glucanos, uma vez que foram detectados também nas culturas em MQD sem sacarose (único substrato da GtfP), (Figura 13B). Compatível com as análises bioquímicas,

análises de MET de precipitados celulares obtidos de culturas em MQDS e MQD revelaram a presença de material sugestivo de EPS apenas em SK36 cultivada em MQDS, o qual estava ausente na cepa mutante SKgtfP cultivada no mesmo meio de cultura (Figura 13C). Também não foram observados EPS nas cepas SK36 e SKgtfP crescidas em MQD sem sacarose (Figura 13C). Assim, SKgtfP é defectiva na produção de glucanos, os quais apresentam solubilidade em água.

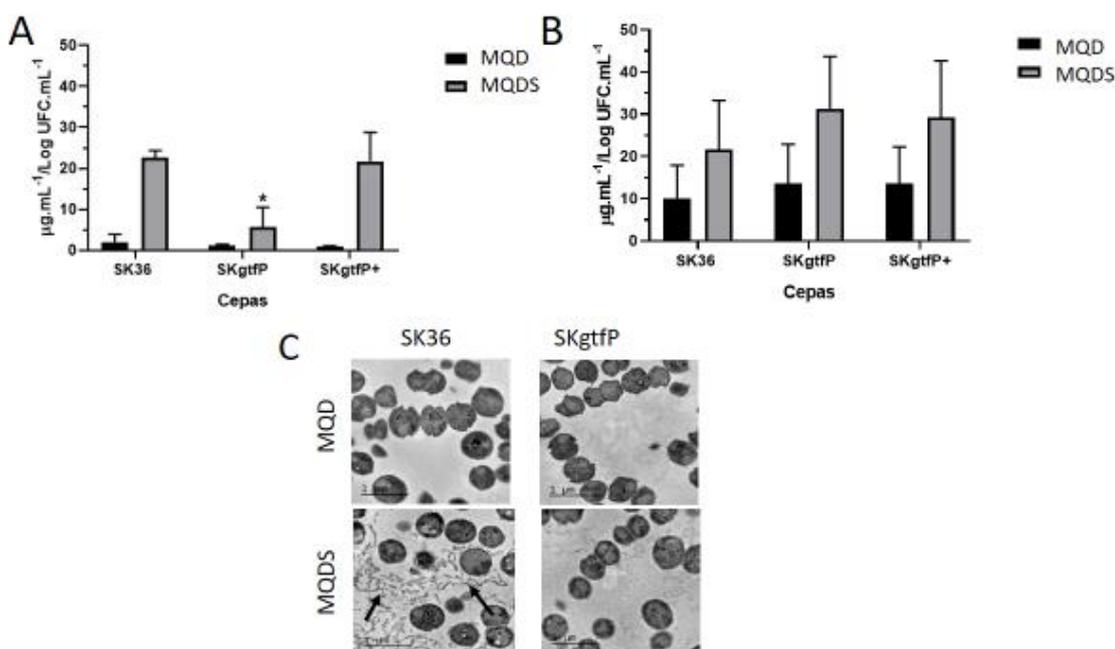


Figura 13 - Efeito da inativação de *gtfP* na produção de EPS por *S. sanguinis*. A) Quantificação bioquímica de EPS solúveis. B) Quantificação bioquímica de EPS insolúveis. A cepa parental SK36 e respectivos mutante isogênica de *gtfP* (SKgtfP) e mutante complementada com cópia de *gtfP* (SKgtfP+) foram crescidas em MQD ou MQDS (37°C, 18 h). Os valores relativos de EPS foram normalizados pelas contagens de bactérias determinadas nas mesmas culturas (log ufc/ml). C) Análises de MET dos EPS produzidos na presença ou não de sacarose. A cepas *S. sanguinis* cultivadas em MDQS e MQD (controle negativo) foram coletadas por centrifugação, lavadas em PBS e processadas para análises de MET. As imagens são representativas de cada cepa (identificadas acima dos painéis) cultivada em MQD ou MQDS (indicados à esquerda). As setas pretas indicam estruturas de EPS insolúvel, as quais estão ausentes nas amostras da respectiva cepa crescida em MQD.

## 5.2 Análise do efeito de eDNA na susceptibilidade de *S. sanguinis* à imunidade mediada pelo sistema complemento

Estudos do nosso e de outros grupos de pesquisa indicam que *S. sanguinis* depende da produção de eDNA para iniciar biofilmes (Moraes et al., 2014; Kreth et al., 2017). Além disso, verificamos que todas as cepas selvagens estudadas produzem eDNA, sendo que a cepa SK160 produz quantidades atipicamente altas de eDNA quando comparada à SK36 e outras cepas incluídas neste estudo (Alves et al., 2022). Os estudos de Alves et al. (2022) revelaram ainda que a produção de eDNA pelas cepas estudadas ocorrem predominantemente sob condições de aeração do meio de cultura BHI (sob agitação), atingindo maiores quantidades após 8 h de incubação a 37 °C. Portanto, realizamos análises quantitativas da deposição de C3b nas cepas SK36, SKspxB e SKspxB+, assim como na cepa SK160 (alta produtora de eDNA) (Alves et al., 2022), cultivadas sob estas mesmas condições, e submetidas ao pré-tratamento com DNase I ou PBS (pH: 7,2) (controle negativo). Incluímos também nestas análises, uma cepa mutante de *vicK* obtida em SK36 (SKvic), assim como a mutante complementada SKvicK+, as quais foram construídas em nossos estudos anteriores (Moraes et al., 2014). O gene *vicK* codifica a proteína histidina quinase do sistema regulador de dois componentes VicRK, o qual regula a homeostase da parede celular e a liberação de eDNA (Moraes et al., 2014). A mutante SKvic produz grande quantidade de eDNA em culturas planctônicas. Para nos assegurar de que variações na deposição de C3b entre as cepas estudadas refletiam os perfis de produção de eDNA nas condições destes ensaios, também quantificamos o eDNA nos fluídos das mesmas culturas utilizadas para os ensaios de deposição de C3b.

Como mostrado na Figura 14A, o tratamento com DNAase I aumentou significativamente a deposição de C3b nas cepas SK36, SKspxB+, SKvic+ e SK160, sendo que as diferenças foram mais intensas entre as cepas mais produtoras de eDNA (Figura 14A,B). A exceção foi com relação à mutante SKvic, possivelmente porque o tratamento com DNase I não foi suficiente para remoção de todo o eDNA produzido por esta cepa, o qual foi detectado em quantidades drasticamente maiores do que todas as outras cepas testadas (Figura 14B). Como esperado, o tratamento com DNase não interferiu significativamente na deposição de C3b sobre a cepa mutante SKspxB, pois esta é defectiva na produção de eDNA (Fig. 14B). Portanto, estes dados indicam que a produção de eDNA

é uma função de escape à deposição do sistema complemento, sendo que cepas com maior produção de eDNA são mais resistentes à deposição de C3b.

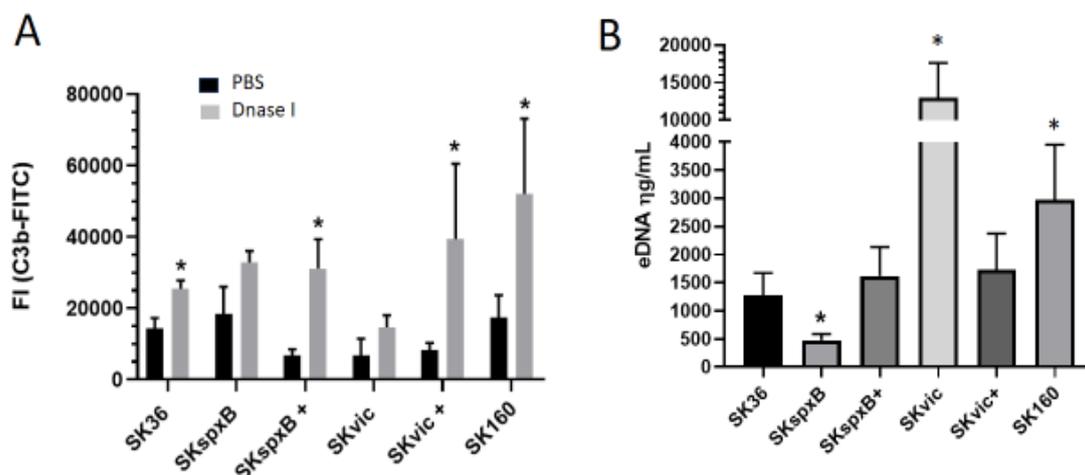


Figura 14 - Efeito do eDNA no escape de *S. sanguinis* à deposição de C3b sistema complemento. (A) Efeito do tratamento com Dnase I na deposição de C3b em cepas *S. sanguinis*. A cepa parental SK36 e mutante SKspxB (defectiva na produção de eDNA) e SKvic (alta produtora de eDNA), assim como as respectivas cepas complementadas (SKspxB+ e SKvic+) e a cepa SK160 (produtora natural de alta quantidade de eDNA) foram crescidas em meio BHI, sob condições que favorecem a produção de eDNA (37°C, aerobiose sob agitação por 8h). A seguir, as bactérias foram coletadas e tratadas com DNase I para remoção do eDNA ou com PBS (controle negativo). As intensidades de deposição de C3b foram determinadas por citometria de fluxo e expressas em índices de fluorescência (FI). As colunas indicam média de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com DNase I e o controle sem tratamento (PBS) (Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn \*  $p < 0,05$ ). (B) Monitoramento da produção de eDNA nas culturas testadas, através de ensaios de qPCR com primers para o gene codificador de RNAr 16SRNAr. As colunas indicam média de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de eDNA em cada cepa, em relação à cepa parental SK36 (Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn \*  $p < 0,05$ ).

### 5.3 Análise do efeito de EPS derivados da sacarose na susceptibilidade de *S. sanguinis* à imunidade mediada pelo sistema complemento

Para investigar o efeito dos EPS derivados da sacarose na evasão ao sistema complemento, comparamos inicialmente as intensidades de deposição de C3b entre a cepa

mutante isogênica de *gtfP* (SKgtfP) e a cepa parental SK36 e cepa complementada SKgtfP+, quando crescidas em meio MQD suplementado ou não com sacarose. Como mostrado na Figura 15, não houve diferenças na deposição de C3b entre SKgtfP e SK36 ou SKgtfP+, quando estas foram crescidas em MQD sem sacarose. Por outro lado, quando cultivadas em MQD suplementado com 1% de sacarose (MQDS), observou-se aumento significativo, embora modesto, na deposição de C3b em SKgtfP, quando comparada à SK36. Mais importante, o fenótipo de deposição de C3b foi restaurado na cepa SKgtfP+. A intensidade de deposição de C3b em SKgtfP+ foi menor do que em SK36, possivelmente pela maior expressão de *gtfP* a partir de múltiplas cópias do plasmídeo pDL278::*gtfP* utilizado para complementação. Desta forma, concluímos que EPS produzidos a partir da sacarose por GtfP (glucanos) são capazes de interferir na deposição de C3b sobre *S. sanguinis*, a despeito da maior solubilidade em água dos glucanos produzidos por *S. sanguinis*, quando comparado a glucanos produzidos por *S. mutans*.

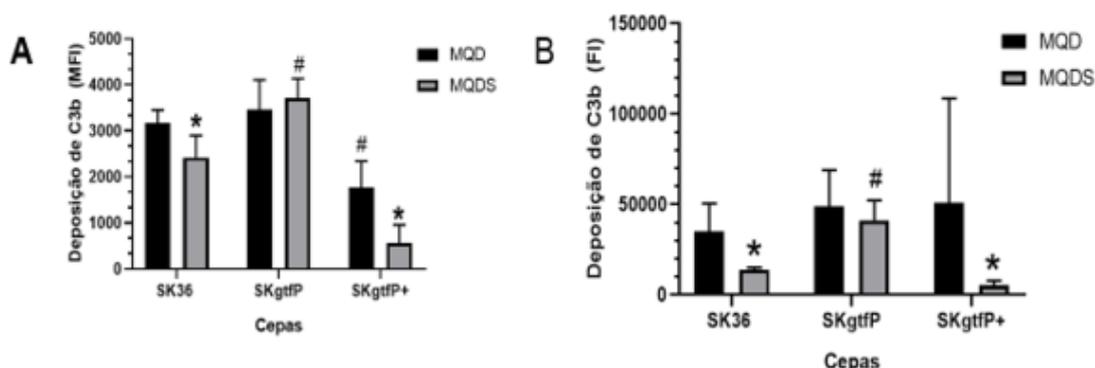


Figura 15 - Influência da inativação de *gtfP* na deposição de C3b do sistema complemento. A cepa parental SK36, mutante isogênica de *gtfP* (SKgtfP) e mutante complementada (SKgtfP+) foram crescidas em MQD ou MQD suplementado com 1% de sacarose (MQDS) sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub> (90% ar) durante 16 h. As absorbâncias das culturas foram aferidas ( $A_{550nm} \approx 0,3$ ) e ajustadas para o equivalente a  $5 \times 10^7$  ufc/mL. As bactérias foram tratadas com soro humano a 20% (em PBS) e as proteínas C3b ligadas à superfície bacteriana marcadas com anticorpo anti-C3b humano conjugado com FITC. As intensidades de deposição de C3b foram analisadas através de citometria de fluxo; as intensidades de fluorescência (média geométrica de intensidade de fluorescência, MFI) e os índices de fluorescência (valores de MFI multiplicados pela porcentagem de células positivas, FI) foram comparados entre as cepas SKgtfP e SKgtfP+ com a cepa parental SK36. As colunas indicam médias de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores de C3b entre as culturas em MQD versus MQDS para a mesma cepa; cerquilhas indicam diferenças significativas em relação à SK36 na mesma condição (Mann-Whitney U-test \*, #  $p < 0,05$ ).

Uma vez que há variação na agregação bacteriana em meios suplementados com sacarose entre as cepas selvagens estudadas (Alves et al., 2022), investigamos também a produção de EPS nestas mesmas cepas cultivadas em MQD e MQDS. Como mostrado na Figura 15A, não houve variações significativas nas quantidades de EPS solúveis em água entre a cepa referência SK36 e as outras cepas clínicas analisadas crescidas em MQDS. Por outro lado, as duas cepas isoladas da corrente sanguínea (SK678 e SK1056) cultivadas em MQDS demonstraram maiores quantidades de EPS insolúveis quando comparadas com SK36 (Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ). Estas foram equivalentes às quantidades de EPS insolúveis produzidos pela cepa *S. mutans* UA159, usada como referência por sabidamente produzir glucanos insolúveis altamente estáveis (Figura 15B). A cepa bucal SK330 também produziu quantidades maiores de EPS insolúveis do que SK36 (Figura 14B). Como esperado, as quantidades de EPS foram muito baixas quando as cepas testadas foram cultivadas em MQD sem sacarose. Análises de MET confirmaram a presença de material extracelular de aparência filamentosa sugestivo de EPS envolvendo as cepas cultivadas em MQDS, nas cepas SK36, SK160, SK678 e SK1056 (Fig. 16C), o qual não foi observado na ausência de sacarose (Fig. 16C; MQD). Além disso, as cepas SK678 e SK1056 crescidas em MQDS apresentavam-se mais espaçadas em comparação às culturas em MQD, sugerindo maior quantidade de material extracelular. Por outro lado, a cepa SK330 apresentou um número elevado de corpúsculos intra-citoplasmáticos sugestivos de polissacarídeos intracelulares (PICs) e pouca quantidade de estruturas sugestivas de EPS (Figura 16C). Os mesmos foram também observados na cepa SK353, embora esta apresentasse também material extracelular semelhante a EPS (Figura 16C).

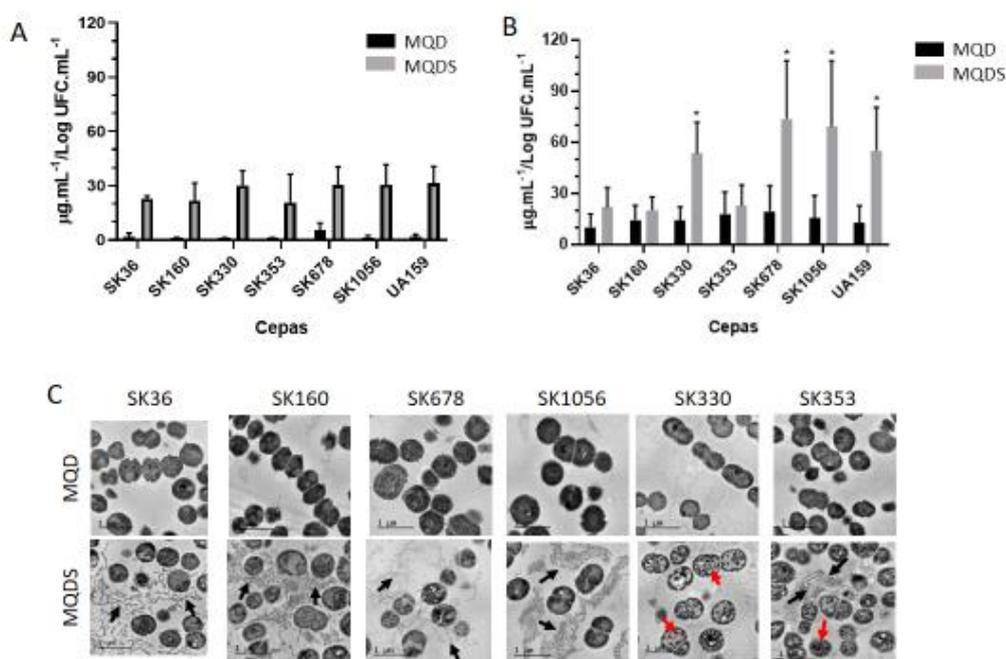


Figura 16 - Análises da produção de EPS solúveis e insolúveis em água por cepas *S. sanguinis*. A) Quantificação bioquímica de EPS solúveis. B) Quantificação bioquímica de EPS insolúveis. As análises bioquímicas foram realizadas com cinco cepas clínicas de *S. sanguinis*; como referência, foram usadas as cepas *S. sanguinis* SK36 e a cepa *S. mutans* UA159. As cepas foram crescidas em meio quimicamente definido suplementado com 1% de sacarose (MQDS) ou sem sacarose (MQD) (37 °C, 18 h). Alíquotas das culturas foram então analisadas pelo método de reação de polissacarídeos com ácido fenol sulfúrico. Os valores relativos de EPS foram normalizados pelas contagens de bactérias (log ufc/ml) determinadas em paralelo. As colunas indicam médias de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes nas quantidades de EPS em MQDS em relação à mesma cepa em MQD. C) Análises de MET dos PECs produzidos na presença ou não de sacarose. As cepas *S. sanguinis* cultivadas em MQDS e MQD (indicados à esquerda) foram coletadas por centrifugação, lavadas em PBS e processadas para análises de MET. As imagens são representativas de cada cepa. As setas pretas indicam estruturas indicativas de EPS insolúvel, as quais estão ausentes nas amostras da respectiva cepa crescida em MQD. As setas vermelhas indicam corpos de inclusão sugestivos de polissacarídeos intracelulares (PIC).

Considerando as grandes variações na produção de EPS insolúvel entre as cepas selvagens, comparamos então a deposição de C3b e as frequências de fagocitose mediada ou não pelo soro entre as mesmas cepas crescidas em MQD e em MQDS.

Conforme mostrado na Figura 17A,B, as cepas com alta produção de EPS insolúvel (SK330, SK678 e SK1056) e SK36, apresentaram reduções significativas na deposição de C3b do complemento quando cultivadas em MQDS em relação às mesmas cepas crescidas em MQD. Ainda compatível com as análises de produção de EPS, não detectamos diferenças significativas na deposição de C3b nas cepas SK160 e SK353 crescidas em MQD *versus* MQDS; estas duas cepas demonstram baixa produção de EPS insolúvel em MQDS (Figura 17). Para confirmar se as reduções na deposição de C3b promovidas pelo cultivo na presença de sacarose, se refletiam na menor susceptibilidade à opsonofagocitose por PMN, as frequências de fagocitose por PMN (mediadas ou não por soro humano) das cepas crescidas em MQD e MQDS foram também avaliadas. Como mostrado na Figura 16C, o crescimento em MQDS promoveu redução significativa na fagocitose mediada por soro humano normal (SN) das cepas SK36, SK330, SK678 e SK1056. Pequena redução na opsonofagocitose de SK160 crescida em MQDS *versus* MQD também foi observada. Estes dados indicam, portanto, a produção de EPS a partir da sacarose reduz a deposição de C3b e a opsonofagocitose por PMN humanos, principalmente em cepas *S. sanguinis* produtoras de maior quantidade de EPS insolúveis derivados da sacarose.

Considerando os achados indicando importância dos EPS derivados de sacarose no escape de *S. sanguinis* à imunidade mediada pelo sistema complemento, procuramos explorar as razões implicadas nas diferenças de produção de EPS pelas cepas testadas. Inicialmente, investigamos os perfis de transcrição dos genes *gtfP* nas cepas testadas durante a fase exponencial de crescimento, assim como polimorfismos nos genes *gtfP*. Como mostrado na Figura 18, a cepa SK36 apresentou níveis de transcritos de *gtfP* significativamente menores do que as outras cepas selvagens testadas, quando crescidas em meio BHI. Além disso, as cepas com maior produção de EPS (SK330, SK353 e SK1056) foram as que apresentaram maior atividade transcricional de *gtfP* entre as cepas testadas, embora a cepa SK678 tenha apresentado níveis de transcritos de *gtfP* pouco maiores do que SK36. Além dos perfis transcricionais de *gtfP*, verificamos também a presença de polimorfismos nas GtfPs expressas por cada cepa testes através de análises de alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos recuperadas dos genomas parciais disponíveis no GenBank (Anexo 1). Estas análises *in silico* revelaram que as regiões mais variáveis entre as GtfPs destas cepas estão contidas na porção N-terminal desta enzima (Figura 19) e não incluem sequências correspondentes ao domínio catalítico, ou às regiões C-terminais responsáveis pela ligação de GtfP aos glucanos recém-sintetizados (Apêndice

1). Foram detectados polimorfismos próximos ao domínio catalítico (posição 326 – 1.140 aa) e à região carboxi-terminal (1.154 – 1.498 aa), a qual contém cinco domínios repetidos de ligação a polissacarídeos (Apêndice 1). Finalmente, investigamos através de análises de MET se, na ausência de sacarose, há material extracelular associado à superfície das cepas estudadas. Como mostrado na Figura 20, não há alterações morfológicas ou material associado à superfícies das cepas crescidas na ausência de sacarose (MQD) por 18h.

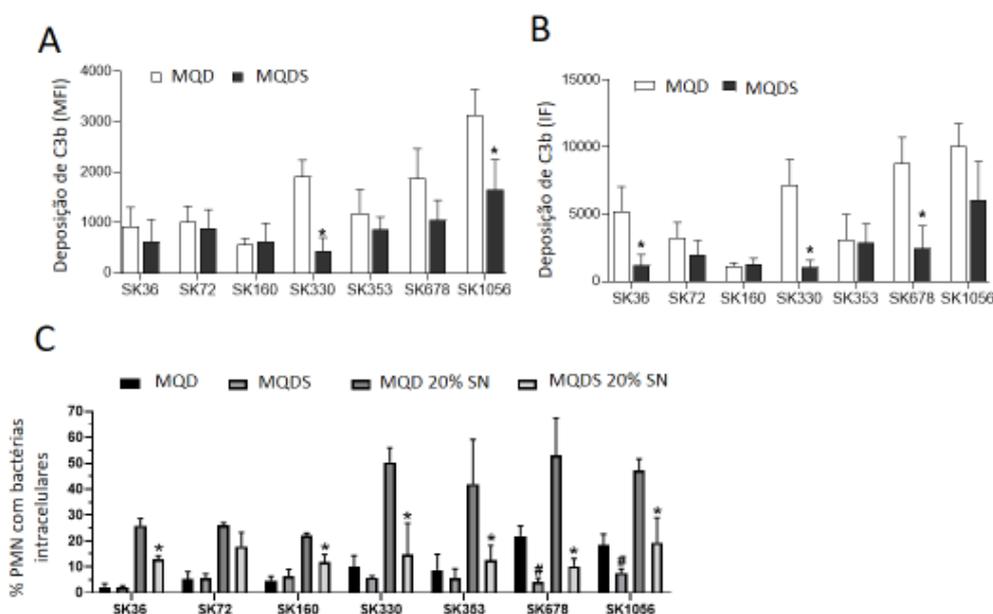


Figura 17 - Efeito dos EPS derivados da sacarose na deposição de C3b e fagocitose por PMN em cepas *S. sanguinis*. A) As cepas crescidas em MQD ou MQD suplementado com 1% de sacarose (MQDS) foram tratadas com 20% de soro humano e os níveis de C3b ligados à superfície bacteriana determinados por citometria de fluxo. Os valores relativos de C3b ligados à superfície bacteriana foram expressos através das médias geométricas de intensidade de fluorescência (MFI) (A), ou pelos índices de fluorescência (IF) obtidos pela multiplicação das porcentagens de células C3b-positivas pelos respectivos valores de MFI (B). Colunas representam dados obtidos em três experimentos independentes; barras indicam os desvios padrão. A,B) Asteriscos, indicam diferenças significativas em relação à mesma cepa crescida em MQD sem sacarose. C) As frequências de fagocitose das cepas foram determinadas por citometria de fluxo em PMN isolados de sangue humano periférico incubados com as cepas marcadas com FITC na ausência ou presença de 20% soro humano normal (SN). Asteriscos e cerquilhas indicam respectivamente, diferenças significativas nas frequências de fagocitose na presença e ausência de SN em relação à mesma cepa crescida em MQD e exposta aos PMN nas mesmas condições. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. \* ou #:  $p < 0,05$ .

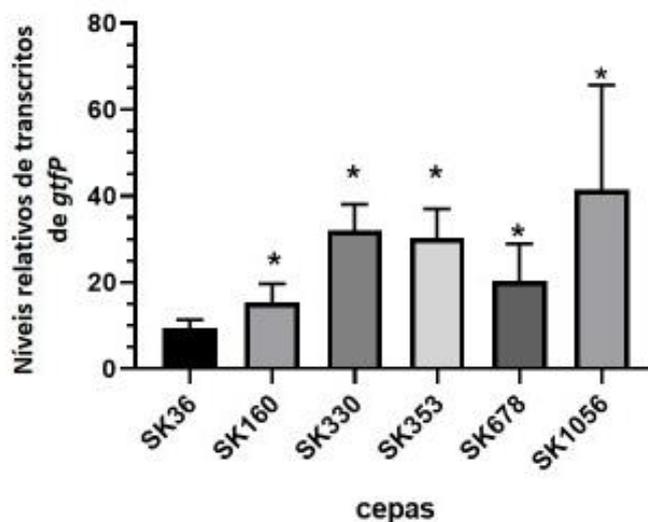


Figura 18 - Níveis relativos de transcritos de gene *gtfP* nas cepas de isolados de *S. sanguinis*. As cepas de *S. sanguinis* foram crescidas em meio BHI em condições atmosféricas com 10% de CO<sub>2</sub> até atingirem o início da fase de crescimento exponencial ( $A_{550nm}$  0,3) para extração de RNA para análises de qPCR. Os valores de transcritos foram normalizados pelos valores de transcritos obtidos para o gene do RNAr 16SRNAr. Curvas padrão foram também utilizadas para os pares de primer utilizados. As colunas representam médias de três experimentos independentes realizados em duplicata; as barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em relação à cepa de referência SK36. ( $p < 0,05$  determinado através do teste de Mann-Whitney).

SK330	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK1056	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK353	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK160	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK36	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK678	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
	*****:*****:*****	
SK330	GSGQPVQVQNSASQLEAEKTSADKVTDAVASEKTEAANTEAQTDAQEPKPAV	120
SK1056	GSGQPVQVQANSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAANTE-----ATATQEPKPAV	114
SK353	GSGQPVQVQANSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAVQTDAQEPKPAV	120
SK160	GSGQPVQVQANSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAAQTDAQEPKPAV	119
SK36	GSGQPVQVQANSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAAQTDAQEPKPAV	119
SK678	GSGQPVQVQANSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAAQTDAQEPKPAV	120
	*****.*****.*****.*.*****. .: * :*:*:***	
SK330	EEATTEKAAVAEAAKANATSETANTAAIQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	180
SK1056	AEAATTEKAAVAEAAKAAANATSETAKTAATAIQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	174
SK353	AEAATTEKAAVAEAAKAAANATSETAKPEAAIQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	180
SK160	-EAATTEKAAVAEAAKAAANATSETAKPEATNQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	178
SK36	-EAATTEKAAVAEAAKAAANATSETAKPEATNQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	178
SK678	AEAATTEKAAVAEAAKAAANATSETAKPEATNQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	180
	*:*****.*****: * *****	

Figura 19 -: Análises dos polimorfismos de GtfP entre as cepas selvagens de *S. sanguinis*. As seqüências protéicas foram recuperadas dos genomas parciais disponíveis no Genbank e submetidas a alinhamento múltiplo, utilizando-se a ferramenta Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). A seqüência consenso é mostrada sob o alinhamento. Os resíduos conservados são mostrados em preto; resíduos polimórficos são indicados verde. A região mais polimórfica na parte amino-terminal (posição 60 – 180 aa), aquém ao domínio catalítico.

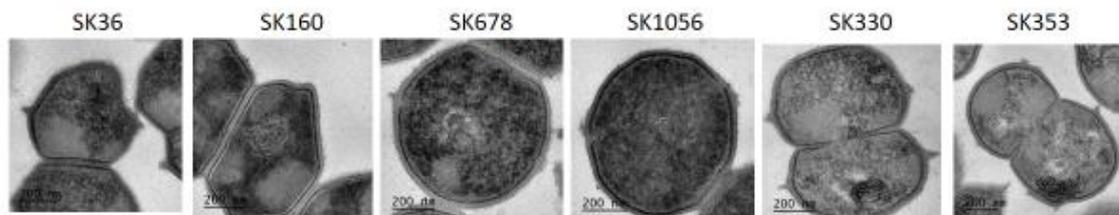


Figura 20 - Análises de MET da superfície da parede celular de cepas *S. sanguinis* crescidas em meio livre de sacarose. As cepas foram crescidas em MQD, a 37°C por 18 h, sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub>. A seguir, as cepas foram coletadas por centrifugação, lavadas com PBS e processadas para análises de MET. As imagens representativas são identificadas com os nomes das respectivas cepas (acima de cada imagem).

#### 5.4 Análise da participação de protease de IgA1 na susceptibilidade de *S. sanguinis* à imunidade mediada pelo sistema complemento

Uma vez que em *S. pneumoniae*, a proteína de parede celular IgA1-protease pode promover escape ao sistema complemento (Janoff et al., 2014), investigamos se a inativação de *iga*, o qual codifica uma protease de IgA1 em SK36, poderia aumentar a susceptibilidade desta cepa à deposição de C3b e opsonofagocitose por PMN de sangue periférico. Para isto, as cepas foram cultivadas em meio BHI até atingir a  $A_{550nm} = 0,3$ . Com mostrado na Figura 21A, a cepa mutante de *iga* (SKiga) demonstrou leve aumento na deposição de C3b quando comparada à cepa parental SK36. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Da mesma forma, a mutante SKiga apresentou pequeno aumento na frequência de fagocitose por PMN de sangue periférico humano em relação à SK36, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Ambas as cepas SK36 e SKiga apresentaram frequências similares de fagocitose por PMN na ausência de soro.

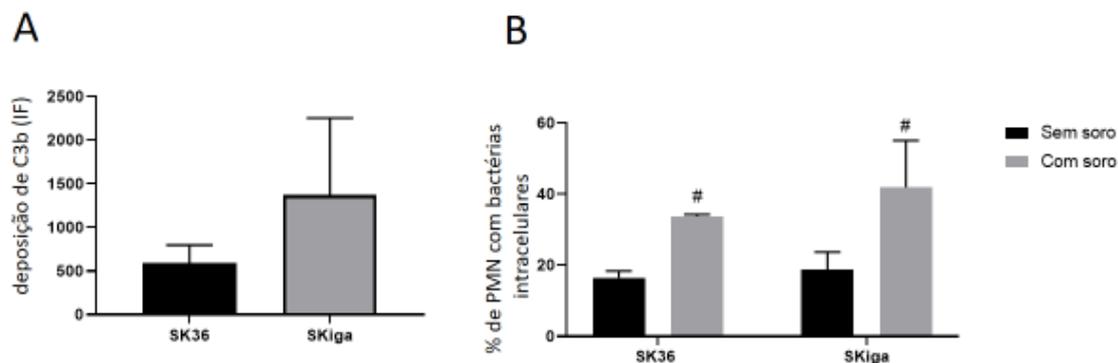


Figura 21 - Efeito da deleção de *iga* em *S. sanguinis* na deposição de C3b e opsonização por PMN. A cepa mutante SKiga e a parental SK36 foram crescidas em BHI sob atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> até atingirem uma A<sub>550nm</sub> = 0,3. A) Deposição de C3b após exposição bacteriana a 20% de soro humano determinada por citometria de fluxo. As intensidades relativas de deposição de C3b foram expressas através dos índices de fluorescência (IF). B) As frequências de fagocitose das cepas foram determinadas por citometria de fluxo em PMN isolados de sangue humano periférico e incubados com as cepas marcadas com FITC na ausência ou presença de 20% soro humano. As colunas representam médias de três experimentos independentes; as barras representam os desvios padrão. Não houve diferenças significativas entre as médias de deposição de C3b ou frequência de fagocitose entre as cepas. As cerquilhas indicam diferenças significativas na frequência de fagocitose na presença de soro em comparação à frequência de fagocitose da mesma cepa na ausência de soro. As barras significam a média de 3 experimentos independentes, # indicam estatisticamente significante comparando à mesma cepa em diferentes condições (p<0,05 determinado através do teste de Mann-Whitney).

## 6 DISCUSSÃO

Embora *S. sanguinis* seja abundante na cavidade bucal e consista numa das espécies de estreptococos bucais mais frequentemente associadas a infecções cardiovasculares oportunistas, os mecanismos através dos quais esta espécie é capaz de persistir na corrente sanguínea e no tecido cardiovascular são pouco compreendidos (Baker et al., 2018; Alves et al., 2022). Neste estudo, foram investigados os fatores expressos por *S. sanguinis* potencialmente envolvidos no escape ao sistema complemento, um braço chave da imunidade inata de humanos, o qual desempenha inúmeras funções para a remoção de microrganismos da corrente sanguínea e dos tecidos do hospedeiro. Uma função central do sistema complemento é a marcação covalente da superfície bacteriana pelo fragmento maior de C3, C3b, gerado pela ativação das cascatas proteolíticas deste sistema iniciadas por três possíveis vias, a via clássica, a via da lectina e via alternativa. Uma vez marcada irreversivelmente por C3b, bactérias Gram-positivas como *S. sanguinis* são mais facilmente reconhecidas por fagócitos, os quais expressam diferentes receptores para C3b. Estudos prévios de diversas cepas *S. sanguinis* demonstram alta correlação entre níveis de deposição de C3b e fagocitose por PMN humanos mediada pelo soro (Alves et al., 2022). A deposição de C3b é muito importante para a remoção de bactérias da corrente sanguínea, através do processo de imuno-aderência, no qual as hemácias se ligam aos complexos bacterianos ligados a C3b através de receptores para C3b, carregando-os para os sistemas fagocíticos do baço e fígado (Birmingham et al., 2001). Análises comparativas da susceptibilidade de diversas cepas de estreptococos à deposição de C3b sugerem que diversas cepas *S. sanguinis* apresentam mecanismos eficientes de escape ao complemento (Alves et al., 2019, 2022). A identificação destes mecanismos seria importante para o desenvolvimento de terapias para prevenção e/ou controle das infecções sistêmicas por esta espécie. Através do presente estudo, verificamos que tanto a produção de eDNA dependente da síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como a produção de EPS a partir da sacarose interferem significativamente na deposição de C3b, assim como na fagocitose mediada pelo soro por PMN de sangue periférico humano. Ambos estes biopolímeros, EPS e eDNA, são componentes importantes dos biofilmes dentários em maturação, principal nicho ecológico de *S. sanguinis*. Desta forma, a interferência na produção destes componentes na cavidade bucal poderá não apenas ser importante para o controle dos biofilmes dentários, mas também para o controle do acesso e persistência destes microrganismos no sistema vascular.

Estudos em *S. mutans* reforçam o papel dos glucanos produzidos a partir da sacarose para o escape bacteriano ao sistema complemento (Alves et al., 2016, 2020; Harth-Chu et al., 2019). Entretanto, os glucanos produzidos por *S. mutans* apresentam estrutura e propriedades diferentes dos glucanos produzidos por *S. sanguinis*, sendo estes últimos menos estáveis e formados predominantemente, por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 (Hamada et al., 1981; Kopec et al., 2001). Estudos prévios indicam que, embora a maioria das cepas da espécie *S. sanguinis* forme biofilmes *in vitro* na presença de sacarose, estes se desprendem facilmente das superfícies, diferindo claramente dos biofilmes formados por *S. mutans* (Hamada et al., 1981; Liu et al., 2017). Estes estudos são compatíveis com resultados do presente estudo demonstrando que a inativação de *gtfP* em SK36 reduziu significativamente a produção de EPS solúveis sintetizados na presença de sacarose. Não verificamos diferenças significativas, entretanto, na produção de EPS insolúveis entre SKgtfP e SK36 ou SKgtfP+ formados na presença de sacarose, ressaltando que os glucanos sintetizados por GtfP são predominantemente solúveis. Dados de produção de EPS solúvel e insolúvel semelhantes aos obtidos para SKgtfP foram reportados para uma cepa *knockout* de *gtfP* obtida a partir da cepa *S. sanguinis* JICC136 isolada de paciente com endocardite infecciosa (Yoshida et al., 2014), reforçando as evidências de que os EPS produzidos por GtfP são solúveis. A fonte dos EPS insolúveis detectadas em culturas em MQD e MQDS precisa ser investigada. Há informação (como “dados não mostrados”) de que a maior parte dos EPS derivados da sacarose produzidos por *S. sanguinis* SK36 são insolúveis (Zhu et al., 2017).

Verificamos também neste estudo, uma diversidade na produção de glucanos insolúveis entre as cepas clínicas de *S. sanguinis*. Interessantemente, as cepas isoladas da corrente sanguínea (SK678 e SK160) corresponderam às cepas com maior produção de EPS insolúveis derivados da sacarose. O estudo de Hamada et al. (1981) relata que cerca de 14,5% das cepas *S. sanguinis* tem uma capacidade aumentada de se aderir ao vidro de forma mais estável na presença de sacarose, embora nenhuma delas produza biofilmes com a alta estabilidade observada nos biofilmes de *S. mutans*. Análises bioquímicas da estrutura dos EPS derivados da sacarose produzidos por estas cepas serão necessárias para entendermos as diferenças nas propriedades destes polímeros. É possível também que cepas com maior produção de EPS insolúvel apresentem maior expressão de GtfP, como sugerem nossas análises transcricionais de *gtfP*, embora estudos mais detalhados da expressão de *gtfP* nestas cepas sejam necessários. Por exemplo, as análises transcricionais

de *gtfP* em cepas crescidas na presença de sacarose e sob diferentes fases de crescimento poderão revelar diferenças mais evidentes na expressão de *gtfP* entre as cepas. De qualquer forma, as análises de qPCR indicaram que SK36 corresponde à cepa com menor expressão de *gtfP* entre as cepas naturais estudadas, e portanto, esta cepa não seja a ideal para avaliar o efeito dos EPS derivados da sacarose no escape ao sistema complemento. Apesar disso, nossas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das cepas SK36 e SKgtfP indicaram a presença de material extracelular característico de EPS somente nas amostras de SK36 crescidas na presença de sacarose (MQDS) e não em culturas obtidas em MQD sem sacarose. Além disso, a cepa SKgtfP não apresentou EPS independente da presença de sacarose, reforçando que os polímeros identificados são realmente derivados da sacarose e dependentes da expressão de GtfP. Os padrões de produção de glucano observados por análises de MET entre as cepas selvagens, foram compatíveis com os dados bioquímicos de produção de polissacarídeos, uma exceção foi a cepa SK330, a qual apresentou um número elevado de corpúsculos intra-citoplasmáticos sugestivos de polissacarídeos intracelulares (PICs), mas pouca quantidade de estruturas de EPS. Os mesmos foram também observados na cepa SK353, embora esta apresentasse também material extracelular semelhante a EPS. Assim, não podemos excluir a hipótese de que parte dos polissacarídeos quantificados em nossas análises bioquímicas de SK330, sejam resultantes de PIC liberados por rompimento das bactérias durante o processo de sonicação. Não acreditamos ser este o caso, pois as determinações de ufc/mL nas amostras utilizadas para a quantificação bioquímica foram coleatadas após a sonicação e mostraram-se muito semelhantes entre todas as cepas. Aspectos morfológicos dos EPS e PICs semelhantes aos observados neste estudo também foram reportados para a cepa *S. mutans* UA159 (Oliveira et al., 2021). Além disso, SK678, SK1056 e SK330 também formam biofilmes de biomassa significativamente maior em meio BHI suplementado com 1% de sacarose, quando comparadas à SK36 (Alves et al., 2022). Mais importante, nossos dados revelaram que a deposição de C3b e a opsonofagocitose por PMN humanos é significativamente reduzida quando as cepas clínicas com maior produção de EPS são cultivadas em MQDS, em comparação às respectivas cepas crescidas em MQD sem sacarose. Portanto, a quantidade e a solubilidade de EPS derivados da sacarose é variável entre cepas, sendo que as cepas com capacidade de produzir maior proporção destes EPS insolúveis a partir da sacarose apresentam susceptibilidade reduzida à deposição de C3b do complemento.

Estudos em espécies de estreptococos da orofaringe (*Streptococcus pyogenes*) e cavidade bucal (*Streptococcus mutans*) sugerem que mutações naturais em genes reguladores de fatores de virulência são selecionadas por pressões do sistema imune do hospedeiro (ou por antibioticoterapia), promovendo a emergência de cepas com maior capacidade de escapar às funções imunológicas do hospedeiro (Horstmann et al., 2011; Mattos-Graner e Duncan, 2017; Oliveira et al., 2021). Entre estes, mutações naturais dos genes que codificam os sistemas reguladores VicRK e CovR foram detectadas em cepas *S. mutans* com capacidade de escapar do sistema complemento (Alves et al., 2020). O sistema de dois componentes VicRK de *S. sanguinis* regula simultaneamente os genes *spxB* e *gtfP* (Moraes et al., 2014). Além disso, o sistema de dois componentes CiaHR modula a formação de biofilmes por *S. sanguinis* através da regulação inversamente proporcional, entre o gene *gtfP* e genes relacionados a síntese de arginina. A deleção do gene *ciaR*, o qual codifica o regulador de resposta do sistema CiaRH de SK36, promove uma redução na síntese de glucanos e menor liberação de eDNA (Zhu et al., 2017), indicando que estes dois polímeros atuam em conjunto para a persistência de *S. sanguinis* nos sítios do hospedeiro. Nas espécies *S. pneumoniae* e *S. mutans*, o sistema CiaRH controla o desenvolvimento de competência, a produção de bacteriocinas e outros fatores de virulência (Halfmann et al., 2007; Qi et al., 2004). *Streptococcus sanguinis* expressa ainda proteínas reguladoras da formação de biofilme BrpT e BrpL (*Biofilm Regulator Protein*), as quais também controlam a síntese de glucanos e liberação de eDNA; a deleção dos genes que codificam BrpT e BrpL causa a super-expressão de *gtfP*, o que promove o aumento da superfície de adesão e biomassa de biofilmes, a despeito da baixa estabilidade destes biofilmes (Liu et al., 2017; Zhu et al., 2017). A espécie *S. sanguinis* produz também a enzima LytF após estímulo por peptídeo estimulador de competência CSP. Essa autolisina causa liberação de eDNA e promove aumento na formação de biofilmes (Cullin et al., 2017). Assim, a complexidade e inter-relação dos sistemas que regulam genes envolvidos na produção de H<sub>2</sub>O, eDNA e EPS derivados da sacarose provavelmente seja um reflexo da grande importância destas funções na persistência de *S. sanguinis* no seu nicho primário, as superfícies dentárias. Pretendemos em estudos futuros, investigar polimorfismos em todas estas proteínas reguladoras entre as cepas clínicas estudadas, o que poderá fornecer informações importantes para esclarecer a diversidade encontrada na produção de EPS insolúveis. Estudos do nosso grupo demonstram que a produção de eDNA é conservada entre a maioria das cepas *S. sanguinis*, embora uma das cepas estudadas, SK160, produza

quantidades atipicamente altas de eDNA quando comparada a SK36 e às outras cepas estudadas (Alves et al., 2022).

Compatível com regulação simultânea de *gtfP* e *spxB* por sistemas reguladores de transcrição, a cepa SKspxB apresentou expressão 2,2 vezes maior de *gtfP* do que a cepa parental SK36 na mesma condição de aerobiose, o que não foi verificado nas culturas estáticas sob atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>. A conexão entre a expressão de SpxB e a síntese de exopolissacarídeos foi também reportada em *S. pneumoniae* (Echlin et al., 2016). Neste estudo, demonstrou-se que a inativação de *spxB* promove redução na síntese de acetil-CoA, requerida para a acetilação de açúcares incorporados em certos tipos de cápsula produzidas por algumas cepas de *S. pneumoniae*, assim como na síntese de peptidoglicano (Echlin et al., 2016). Os autores deste estudo sugerem que a inativação de *spxB* nesta espécie produtora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compromete a virulência de *S. pneumoniae* por atenuar a formação de cápsula de forma cepa-específica (Echlin et al., 2016). A maior atividade de *gtfP* detectada em SKspxB, é compatível com a hipótese de que GtfP atue não somente na síntese de matriz extracelular em biofilmes, mas seja importante para a proteção de *S. sanguinis* contra fatores do hospedeiro que tenham a parede celular como alvo. Neste estudo verificamos que a inativação de *gtfP* promove alterações na morfologia de *S. sanguinis*, e achados semelhantes foram reportados anteriormente (Yoshida et al., 2014). Uma vez que o mutante SKspxB é defectivo na produção de eDNA de forma dependente da produção de peróxido, uma outra hipótese é que o aumento no nível de transcrição do gene *gtfP* tenha ocorrido como mecanismo compensatório à deficiência na liberação de eDNA, um componente importante para adesão celular e formação de biofilmes.

Outro dado interessante, é que a cepa SKspxB quando crescida em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub> apresentou níveis de transcrição do gene *iga* 4,4 vezes maior que a cepa selvagem SK36 na mesma condição (figura 11). A imunoglobulina A1 (IgA1) é a classe de anticorpos mais abundante na saliva (Per Brandtzaeg, 2014). A persistência de *S. sanguinis* na saliva humana é dependente do sistema de dois componentes SptRS o qual controla também a produção de eDNA e regula simultaneamente os genes *spxB* e *iga* (Camargo et al., 2018). Neste estudo, mostramos que SKiga apresentou aumento limitado na susceptibilidade à deposição de C3b e opsonofagocitose por PMN em relação à SK36, quando as cepas foram crescidas em meio BHI. Entretanto, é possível que o efeito da protease de IgA1 na proteção de *S. sanguinis*, seja dependente da presença de eDNA.

Estudos em *Neisseria meningitidis* indicam que a IgA protease produzida por esta espécie tem a capacidade de se ligar ao eDNA disponível no meio, enquanto que a ausência dessa protease resulta em menor formação de biofilmes (Arenas et al., 2013). Estes dados ressaltam a complexidade em se analisar o efeito individual de EPS, eDNA e da IgA1 protease na virulência sistêmica de *S. sanguinis*. Desta forma, foi importante para este estudo, não apenas investigar os fenótipos de ligação à C3b e opsonização por PMN nas cepas mutantes SKspxB, SKgtfP e SKiga, mas também avaliar o efeito de EPS e eDNA em cepas selvagens isoladas da cavidade bucal e da corrente sanguínea.

As diferenças na produção de EPS insolúveis derivados da sacarose entre SK678/SK1056 e SK36 precisam ser exploradas em estudos futuros. Estudos genéticos e imunológicos revelaram que diversas cepas *S. sanguinis* apresentam o operon homólogo ao operon *cps* de *S. pneumoniae* para a síntese de cápsula polissacarídica, sendo capazes de sintetizar cápsulas antigenicamente idênticas às cápsulas produzidas por diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* (Sorensen et al., 2016). Entretanto, não detectamos nas análises de MET, material extracelular associado à superfícies de SK36 ou de outras cepas *S. sanguinis* cultivadas em MQD, que pudesse indicar a expressão de cápsulas semelhantes às produzidas por *S. pneumoniae* (Amerigh et al., 2016). Portanto, pelo menos nas condições de cultivo utilizadas neste projeto, as cepas *S. sanguinis* não expressaram o operon *cps*. Por outro lado, diferenças estruturais dos glucanos produzidos por estreptococos podem ser resultantes de polimorfismos de Gtfs, uma vez que estas enzimas são altamente polimórficas, pelo menos na espécie *S. mutans* (Mattos-Graner et al., 2001; Mattos-Graner et al., 2004). Portanto, investigamos a presença de polimorfismos nas enzimas GtfP expressas pelas cepas estudadas que pudessem explicar a maior produção de EPS insolúveis pelas cepas SK678 e SK1056. O alinhamento das sequências de GtfP obtidas com a sequência referência de SK36 (disponível no GenBank), não revelou entretanto, polimorfismos que pudessem justificar diferenças na solubilidade dos glucanos produzidos por SK678 e SK1056, uma vez que as regiões mais variáveis entre as cepas não envolvem o domínio catalítico ou as regiões C-terminais responsáveis pela ligação de GtfP aos glucanos recém-sintetizados. Além disso, análises genômicas mais detalhadas investigando a presença de cópias adicionais de enzimas Gtfs poderão revelar novas informações. Em *S. mutans*, há variações nos números de genes GtfB/C/D entre as cepas (Mattos-Graner et al., 2004). Pretendemos ainda obter uma cepa mutante isogênica de *gtfP* a partir da cepa SK678 em estudos paralelos de nosso grupo, a qual poderá ser útil para

elucidar este assunto. Além disso, estudos do nosso grupo realizados com cepas de *Streptococcus mitis*, revelam ainda que não somente a produção de EPS a partir da sacarose é importante para o escape à deposição de C3b, mas a expressão de proteínas ligadoras de glucano, como a GbpB (*glucan-binding protein B*, também conhecida como PcsB) (Harth-Chu et al., 2019). Cepas da espécie *S. mitis* não expressam enzimas Gtfs (Xu et al., 2018), mas podem expressar altos níveis de GbpB/PcsB e ligar-se de forma estável a glucanos sintetizadas pelas enzimas GtfB/C secretadas por *S. mutans* (Harth-Chu et al., 2019). Este é um exemplo de cooperação entre espécies comuns nos biofilmes dentários que influenciam na persistência e/ou virulência. Assim, também será importante investigar se as cepas SK678 e SK1056 apresentam maior capacidade de ligação a EPS.

A disponibilidade de oxigênio é um importante fator ambiental que pode modificar o perfil metabólico dos microrganismos bucais. Como espécie pioneira dos dentes, *S. sanguinis* deve expressar funções de tolerância à exposição ao O<sub>2</sub> molecular. Para isto, *S. sanguinis* expressa a enzima SpxB (piruvato oxidase) que converte fosfato inorgânico e piruvato na presença de O<sub>2</sub>, em acetil fosfato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. O peróxido produzido por SK36 nessas condições, causa a liberação de eDNA (Kreth et al., 2009). O eDNA liberado promove a agregação celular e compõem uma matriz extracelular para o início da formação de biofilmes (Kreth et al., 2009; Moraes et al., 2018). Assim, a cepa SK36 apresenta a expressão de *spxB* regulada de acordo com a disponibilidade de O<sub>2</sub> no ambiente; culturas de SK36 obtidas em anaerobiose apresentam baixa expressão de *spxB*, a qual é cerca de 25 vezes inferior à expressão desse gene em culturas aeróbicas (Kreth et al., 2009). Esses achados se assemelham aos obtidos no presente estudo, no qual a expressão do gene *spxB* foi consideravelmente menor em culturas crescidas em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub> do que em culturas obtidas em aerobiose, sob agitação. O estudo realizado por Kreth et al. (2009), demonstrou que a diferença na liberação de eDNA entre a cepa selvagem SK36 e uma cepa defectiva no gene *spxB* continua aumentando após o final da fase de crescimento exponencial, chegando a ser 10 vezes maior para a cepa selvagem na fase estacionária de crescimento. No presente estudo, verificamos que as cepas estudadas não apresentaram diferenças significativas quanto a liberação de eDNA no início da fase exponencial de crescimento (dados não mostrados), possivelmente pela baixa expressão de *spxB*. Por outro lado, redução significativa da produção de eDNA foi observada quando as cepas foram crescidas por cerca de 8h, confirmando resultados prévios com as mesmas cepas (Alves et al., 2022). Mais importante, o tratamento com DNase I foi capaz de

aumentar significativamente a deposição de C3b nas cepas produtoras de eDNA, SK36 e SK160, mas não nas cepas SKspxB a qual é defectiva na produção de eDNA. O efeito do tratamento com DNAase I também aumentou significativamente a deposição de C3b nas mutantes complementadas SKspxB<sup>+</sup> e SKvic<sup>+</sup>, ambas produtoras de eDNA. Por outro lado, o tratamento com DNAse I não afetou significativamente a deposição de C3b sobre a cepa SKvic, a qual produz quantidades muito altas de eDNA, provavelmente porque o tratamento com DNAse não foi suficiente para eliminação de todo o eDNA produzido por esta mutante. Portanto, os dados obtidos neste estudo indicam que o eDNA produzido por *S. sanguinis* interfere na deposição de C3b do sistema complemento. Este é o primeiro estudo de nosso conhecimento que demonstra que a produção de eDNA favorece o escape ao sistema complemento.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo indicam que a produção de eDNA e/ou de glucanos sintetizados a partir da sacarose promovem escape à imunidade mediada pelo sistema complemento em cepas da espécie *S. sanguinis*. Esta conclusão é suportada pelas seguintes conclusões das análises experimentais:

- a) Há diversidade entre cepas quanto à susceptibilidade à deposição de C3b do sistema complemento e à opsonofagocitose por PMN de sangue periférico humano.
- b) Há diversidade na produção de glucanos insolúveis e solúveis em água entre cepas *S. sanguinis*, assim como na expressão do gene *gtfP*.
- c) A inativação de *spxB* e *gtfP* em SK36 compromete respectivamente, a produção de eDNA e de glucanos solúveis.
- d) O tratamento com cepas *S. sanguinis* com DNase I aumenta a deposição de C3b do sistema complemento e a opsonofagocitose por PMN humanos entre cepas com maior produção de eDNA.
- e) A inativação de *spxB* na cepa SK36, elimina o efeito do tratamento com DNase I na susceptibilidade à deposição de C3b.
- f) A deleção de *gtfP* ou a ausência de sacarose, único substrato para a síntese de glucanos, aumenta a susceptibilidade de cepas *S. sanguinis* à deposição de C3b e à opsonofagocitose por PMN de sangue periférico humano.
- g) Sob as condições experimentais avaliadas, a inativação de *iga* não afeta significativamente a deposição de C3b ou a opsonofagocitose por PMN na cepa SK36.

## REFERÊNCIAS

1. Alves LA, Nomura R, Mariano FS, Harth-chu EN, Stipp RN, Nakano K, et al. CovR regulates streptococcus mutans susceptibility to complement immunity and survival in blood. *Infect Immun*. 2016; 84(11):3206-3219. doi: 10.1128/IAI.00406-16.
2. Alves LA, Ganguly T, Mattos-Graner RO, Kajfasz J, Harth-Chu EN, Lemos JA, et al. CovR and VicRKX Regulate Transcription of the Collagen Binding Protein Cnm of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2018 Nov;200(23):e00141-18. doi: 10.1128/JB.00141-18.
3. Alves LA, de Carli TR, Harth-Chu EN, Mariano FS, Höfling JF, Stipp RN, et al. Oral streptococci show diversity in resistance to complement immunity. *J Med Microbiol*. 2019 Apr;68(4):600-8. doi: 10.1099/jmm.0.000955.
4. Alves LA, Ganguly T, Harth-Chú ÉN, Kajfasz J, Lemos JA, Abranches J, et al. PepO is a target of the two-component systems VicRK and CovR required for systemic virulence of *Streptococcus mutans*. *Virulence*. 2020;11(1):521-36. doi: 10.1080/21505594.2020.1767377.
5. Alves LA, Salvatierra GC, Freitas VA, Höfling JF, Bastos DC, Araujo TLS, et al. Diversity in phenotypes associated with host persistence and systemic virulence in streptococcus sanguinis strains. *Front Microbiol*. 2022 Apr;13:875581. doi: 10.3389/fmicb.2022.875581.
6. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020 Apr;26(4):450-52. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
7. Andoh A, Fujiyama Y, Kimura T, Uchihara H, Sakumoto H, Okabe H, et al. Molecular characterization of complement components (C3, C4, and factor B) in human saliva. *J Clin Immunol*. 1997 Sep;17(5):404-7. doi: 10.1023/a:1027320425291.
8. Arenas J, Nijland R, Rodriguez FJ, Bosma TNP, Tommassen J. Involvement of three meningococcal surface-exposed proteins, the heparin-binding protein NhbA, the  $\alpha$ -peptide of IgA protease and the autotransporter protease NalP, in initiation of biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2013 Jan;87(2):254-68. doi: 10.1111/mmi.12097.

9. Argimón S, Caufield PW. Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. *J Clin Microbiol*. 2011 Mar;49(3):984-92. doi: 10.1128/JCM.01993-10.
10. Baker SP, Nulton TJ, Kitten T. Genomic, phenotypic, and virulence analysis of *streptococcus sanguinis* oral and infective-endocarditis isolates. *Infect Immun*. 2018 Dec 19;87(1):e00703-18. doi: 10.1128/IAI.00703-18.
11. Berends ET, Dekkers JF, Nijland R, Kuipers A, Soppe JA, van Strijp JA, et al. Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. *Cell Microbiol*. 2013 Dec;15(12):1955-68. doi: 10.1111/cmi.12170.
12. Bessen DE. Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. *Infect Genet Evol*. 2009 Jul;9(4):581-93. doi: 10.1016/j.meegid.2009.03.002.
13. Birmingham DJ, Hebert LA. CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors. *Immunol Rev*. 2001 Apr; 180:100-11. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1800109.x.
14. Bishop CJ, Aanensen DM, Jordan GE, Kilian M, Hanage WP, Spratt BG. Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol*. 2009 Jan;7:3. doi: 10.1186/1741-7007-7-3.
15. Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *J Oral Microbiol*. 2013;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20401.
16. 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.
17. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):4018-23. doi: 10.1128/IAI.68.7.4018-4023.2000.

18. Chhibber-Goel J, Singhal V, Bhowmik D, Vivek R, Parakh N, Bhargava B, Sharma A. Linkages between oral commensal bacteria and atherosclerotic plaques in coronary artery disease patients. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016 Dec 19;2:7. doi: 10.1038/s41522-016-0009-7.
19. Corrado D, Migliore F, Basso C, Thiene G. Exercise and the risk of sudden cardiac death. *Herz*. 2006 Sep;31(6):553-8. doi: 10.1007/s00059-006-2885-8.
20. Costa Oliveira BE, Ricomini Filho AP, Burne RA, Zeng L. The route of sucrose utilization by streptococcus mutans affects intracellular polysaccharide metabolism. *Front Microbiol*. 2021 Feb;12:636684. doi: 10.3389/fmicb.2021.636684
21. Cullin N, Merritt J, Kreth J. Beyond cell division: the ecological roles of autolysins in oral biofilm communities. *Curr Oral Health Rep*. 2017;4:14-21. doi: 10.1007/s40496-0170118-2.
22. Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe*. 2011 Oct;10(4):302-6. doi: 10.1016/j.chom.2011.09.008.
23. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jul;8(7):481-90. doi: 10.1038/nrmicro2337.
24. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol*. 2010 May;76(10):3405-8. doi: 10.1128/AEM.03119-09.
25. 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.
26. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Apr;72(4):2837-48. doi: 10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006.

27. Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2013 Jul;81(7):2606-15. doi: 10.1128/IAI.00491-13.
28. 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.
29. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*. 1951;168:167.  
<https://doi.org/10.1038/168167a0>.
30. Echlin H, Frank MW, Iverson A, Chang TC, Johnson MD, Rock CO, et al. Pyruvate oxidase as a critical link between metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*. 2016 Oct;12(10):e1005951. doi: 10.1371/journal.ppat.1005951.
31. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):613-30. doi: 10.1128/CMR.15.4.613-630.2002.
32. Fernandes CP, Oliveira FA, Silva PG, Alves AP, Mota MR, Montenegro RC, et al. Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease. *Int J Cardiol*. 2014 Jul;174(3):710-2. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.201.
33. 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.
34. Gong K, Mailloux L, Herzberg MC. Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem*. 2000 Mar;275(12):8970-4. doi: 10.1074/jbc.275.12.8970.
35. Gunput ST, Ligtenberg AJ, Terlouw B, Brouwer M, Veerman EC, Wouters D. Complement activation by salivary agglutinin is secretor status dependent. *Biol Chem*. 2015 Jan;396(1):35-43. doi: 10.1515/hsz-2014-0200.

36. Hajishengallis G, Lambris JD. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology*. 2012 Nov;217(11):1111-6. doi: 10.1016/j.imbio.2012.07.007.
37. Hajishengallis G, Kajikawa T, Hajishengallis E, Maekawa T, Reis ES, Mastellos DC, et al. Complement-dependent mechanisms and interventions in periodontal disease. *Front Immunol*. 2019 Mar;10:406. doi: 10.3389/fimmu.2019.00406.
38. Halfmann A, Kovács M, Hakenbeck R, Brückner R. Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Mol Microbiol*. 2007 Oct;66(1):110-26. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05900.x.
39. Hamada S, Torii M, Kotani S, Tsuchitani Y. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interactions of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Infect Immun*. 1981 Apr;32(1):364-72. doi: 10.1128/iai.32.1.364-372.1981.
40. Harth-Chu EN, Alves LA, Theobaldo JD, Salomão MF, Höfling JF, King WF, et al. PcsB expression diversity influences on streptococcus mitis phenotypes associated with host persistence and virulence. *Front Microbiol*. 2019 Nov;10:2567. doi: 10.3389/fmicb.2019.02567.4
41. Horstmann N, Sahasrabhojane P, Suber B, Kumaraswami M, Olsen RJ, Flores A, et al. Distinct single amino acid replacements in the control of virulence regulator protein differentially impact streptococcal pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2011 Oct;7(10):e1002311. doi: 10.1371/journal.ppat.1002311.
42. Hyde TP, Craddock HL, Gray JC, Pavitt SH, Hulme C, Godfrey M, et al. A randomised controlled trial of complete denture impression materials. *J Dent*. 2014 Aug;42(8):895-901. doi: 10.1016/j.jdent.2014.02.005.
43. Hymes SR, Randis TM, Sun TY, Ratner AJ. DNase inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilms in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 2013 May;207(10):1491-7. doi: 10.1093/infdis/jit047.
44. Ihara M, Yamamoto Y. Emerging evidence for pathogenesis of sporadic cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2016 Feb;47(2):554-60. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009627.

45. Itzek A, Zheng L, Chen Z, Merritt J, Kreth J. Hydrogen peroxide-dependent DNA release and transfer of antibiotic resistance genes in *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol.* 2011 Dec;193(24):6912-22. doi: 10.1128/JB.05791-11.
46. Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol.* 2013 Dec;57(6):467-75. doi: 10.1111/lam.12134.
47. Janoff EN, Rubins JB, Fasching C, Charboneau D, Rahkola JT, Plaut AG, et al. Pneumococcal IgA1 protease subverts specific protection by human IgA1. *Mucosal Immunol.* 2014 Mar;7(2):249-56. doi: 10.1038/mi.2013.41.
48. Jones EA, McGillivray G, Bakaletz LO. Extracellular DNA within a nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *J Innate Immun.* 2013;5(1):24-38. doi: 10.1159/000339961.
49. Kakahi FB, Kang D, Volke D, Wirth NT, Nickel PI, Delvigne F. Extracellular DNA (eDNA) enables early detection of the phenotypic switch of *Pseudomonas* sp. during biofilm development. *bioRxiv.* 2021 Feb 11. doi: 10.1101/2021.02.11.430776.
50. Kang SO, Wright JO, Tesorero RA, Lee H, Beall B, Cho KH. Thermoregulation of capsule production by *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One.* 2012;7(5):e37367. doi: 10.1371/journal.pone.0037367.
51. Kang M, Ko YP, Liang X, Ross CL, Liu Q, Murray BE, et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J Biol Chem.* 2013 Jul;288(28):20520-31. doi: 10.1074/jbc.M113.454462.
52. Kilian M, Mestecky J, Russell MW. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev.* 1988 Jun;52(2):296-303. doi: 10.1128/mr.52.2.296-303.1988.
53. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 2006;42:47-79. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x.

54. Kopec LK, Vacca Smith AM, Wunder D, Ng-Evans L, Bowen WH. Properties of *Streptococcus sanguinis* glucans formed under various conditions. *Caries Res.* 2001 Jan-Feb;35(1):67-74. doi: 10.1159/000047434.
55. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Co-ordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. *Mol Microbiol.* 2005 Jul;57(2):392-404. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04695.x.
56. 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.
57. 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.
58. Kristian SA, Birkenstock TA, Sauder U, Mack D, Götz F, Landmann R. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis.* 2008 Apr;197(7):1028-35. doi: 10.1086/528992.
59. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Feb;6(2):132-42. doi: 10.1038/nrmicro1824.
60. Lee YL, Hu HY, Huang N, Hwang DK, Chou P, Chu D. Dental prophylaxis and periodontal treatment are protective factors to ischemic stroke. *Stroke.* 2013a Apr;44(4):1026-30. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000076.
61. 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.* 2013b Jul;8(7):e67919. doi: 10.1371/journal.pone.0067919.
62. Li J, Siegrist J. Physical activity and risk of cardiovascular disease--a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Environ Res Public Health.* 2012 Feb;9(2):391-407. doi: 10.3390/ijerph9020391.
63. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn SJ, et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via

membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol.* 2014 Jul;196(13):2355-66. doi: 10.1128/JB.01493-14.

64. Liszewski MK, Atkinson JP. The role of complement in autoimmunity. *Immunol Ser.* 1991;54:13-37.
65. Liu J, Stone VN, Ge X, Tang M, Elrami F, Xu P. TetR family regulator brpt modulates biofilm formation in streptococcus sanguinis. *PLoS One.* 2017 Jan;12(1):e0169301. doi: 10.1371/journal.pone.0169301.
66. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation.* 2008 Jun;117(24):3118-25. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758524.
67. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017 Mar;44 Suppl 18:S12-S22. doi: 10.1111/jcpe.12679.
68. Matsushita M. Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. *J Innate Immun.* 2010;2(1):24-32. doi: 10.1159/000228160.
69. Mattos-Graner RO, Duncan MJ. Two-component signal transduction systems in oral bacteria. *J Oral Microbiol.* 2017 Nov;9(1):1400858. doi: 10.1080/20002297.2017.1400858.
70. Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, Duncan MJ, Smith DJ. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4586-92. doi: 10.1128/JCM.42.10.4586-4592.2004.
71. McDevitt E, Khan F, Scasny A, Thompson CD, Eichenbaum Z, McDaniel LS, et al. Hydrogen peroxide production by streptococcus pneumoniae results in alpha-hemolysis by oxidation of oxy-hemoglobin to met-hemoglobin. *mSphere.* 2020 Dec;5(6):e01117-20. doi: 10.1128/mSphere.01117-20.
72. Merchant ME, Verret B, Elsey RM. Role of divalent metal ions in serum complement activity of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2005 Jul;141(3):289-93. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.03.006.

73. 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.
74. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3313-7. doi: 10.1128/JCM.00377-06.
75. Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, Igarashi M, Manzoor R, Ohnuma A, et al. Genetic predisposition to acquire a polybasic cleavage site for highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin. *mBio*. 2017 Feb 14;8(1):e02298-16. doi: 10.1128/mBio.02298-16.
76. Niven CF Jr, White JC. A study of streptococci associated with subacute bacterial endocarditis. *J Bacteriol*. 1946 Jun;51(6):790. doi: 10.1128/jb.51.6.790-790.1946.
77. Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Jun;33:73-80. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.002.
78. Oliveira LT, Alves LA, Harth-Chu EN, Nomura R, Nakano K, Mattos-Graner RO. VicRK and CovR polymorphisms in *Streptococcus mutans* strains associated with cardiovascular infections. *J Med Microbiol*. 2021 Dec;70(12). doi: 10.1099/jmm.0.001457.
79. Poulsen K, Reinholdt J, Kilian M. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) and its translation product. *Infect Immun*. 1996 Oct;64(10):3957-66. doi: 10.1128/iai.64.10.3957-3966.1996.
80. Qi F, Merritt J, Lux R, Shi W. Inactivation of the *ciaH* Gene in *Streptococcus mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4895-9. doi: 10.1128/IAI.72.8.4895-4899.2004.
81. Ramos-Montañez S, Kazmierczak KM, Hentchel KL, Winkler ME. Instability of *ackA* (acetate kinase) mutations and their effects on acetyl phosphate and ATP

- amounts in *Streptococcus pneumoniae* D39. *J Bacteriol.* 2010 Dec;192(24):6390-400. doi: 10.1128/JB.00995-10.
82. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):785-97. doi: 10.1038/ni.1923.
83. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol.* 2001 Sep;167(5):2861-8. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2861
84. Salam MA, Nakao R, Yonezawa H, Watanabe H, Senpuku H. Human T-cell responses to oral streptococci in human PBMC-NOD/SCID mice. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Jun;21(3):169-76. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00272.x.
85. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Cloning and sequence analysis of the *gbpC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1997 Feb;65(2):668-75. doi: 10.1128/iai.65.2.668-675.1997.
86. Sitkiewicz I. How to become a killer, or is it all accidental? Virulence strategies in oral streptococci. *Mol Oral Microbiol.* 2018 Feb;33(1):1-12. doi: 10.1111/omi.12192.
87. Skov Sørensen UB, Yao K, Yang Y, Tettelin H, Kilian M. Capsular polysaccharide expression in commensal streptococcus species: genetic and antigenic similarities to *Streptococcus pneumoniae*. *mBio.* 2016 Nov;7(6):e01844-16. doi: 10.1128/mBio.01844-16.
88. Stipp RN, Boisvert H, Smith DJ, Höfling JF, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. *CovR* and *VicRK* regulate cell surface biogenesis genes required for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 2013;8(3):e58271. doi: 10.1371/journal.pone.0058271.
89. Senty Turner L, Das S, Kanamoto T, Munro CL, Kitten T. Development of genetic tools for in vivo virulence analysis of *Streptococcus sanguinis*. *Microbiology (Reading).* 2009 Aug;155(Pt 8):2573-82. doi: 10.1099/mic.0.024513-0.

90. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Apr;344(14):1058-66. doi: 10.1056/NEJM200104053441406.
91. Wang S, Liu X, Liu H, Zhang L, Guo Y, Yu S, et al. The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*. 2015 Apr;7(2):330-40. doi: 10.1111/1758-2229.12252.
92. Writing Group Members; Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, et al. American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan;133(4):e38-360. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.
93. Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Falkner KL, Dorn JP, Sempos CT. Examination of the relation between periodontal health status and cardiovascular risk factors: serum total and high density lipoprotein cholesterol, C-reactive protein, and plasma fibrinogen. *Am J Epidemiol*. 2000 Feb;151(3):273-82. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a010203.
94. 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.
95. Xu RR, Yang WD, Niu KX, Wang B, Wang WM. An Update on the Evolution of Glucosyltransferase (Gtf) Genes in *Streptococcus*. *Front Microbiol*. 2018 Dec;9:2979. doi: 10.3389/fmicb.2018.02979.
96. 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.
97. Yuste J, Ali S, Sriskandan S, Hyams C, Botto M, Brown JS. Roles of the alternative complement pathway and C1q during innate immunity to *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol*. 2006 May;176(10):6112-20. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6112.
98. Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jönsson G, Tay LS, Hyams C, et al. Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from

subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect Immun.* 2008 Aug;76(8):3761-70. doi: 10.1128/IAI.00291-08.

99. Zhu B, Ge X, Stone V, Kong X, El-Rami F, Liu Y, et al. *ciaR* impacts biofilm formation by regulating an arginine biosynthesis pathway in *Streptococcus sanguinis* SK36. *Sci Rep.* 2017 Dec;7(1):17183. doi: 10.1038/s41598-017-17383-1.
100. Zhu B, Song L, Kong X, Macleod LC, Xu P. a novel regulator modulates glucan production, cell aggregation and biofilm formation in *streptococcus sanguinis* SK36. *Front Microbiol.* 2018 May;9:1154. doi: 10.3389/fmicb.2018.01154.
101. Zhu B, Green SP, Ge X, Puccio T, Nadhem H, Ge H, et al. Genome-wide identification of *Streptococcus sanguinis* fitness genes in human serum and discovery of potential selective drug targets. *Mol Microbiol.* 2021 Apr;115(4):658-71. doi: 10.1111/mmi.14629.
102. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):729-40. doi: 10.1038/nri2620.

## APÊNDICE 1 – ALINHAMENTO MÚLTIPLO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS GTFP de *S. sanguinis*

SK330	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK1056	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK353	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK160	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK36	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
SK678	MMEKKIHYKMHKVKKNWVAIGVTTLALIVAPKVLGLEAGLVHADDVKQVAVQEP	60
	*****:*****:*****	
SK330	GSGQPVQVQNSASQLEAEKTSADKVTDAVASEKTAETAANTEAQTDAQEP	120
SK1056	GSGQPVQVQNSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAANTE-----ATAQEP	114
SK353	GSGQPVQVQNSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAVQTDQEP	120
SK160	GSGQPVQVQNSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAAQTDQEP	119
SK36	GSGQPVQVQNSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAAQTDQEP	119
SK678	GSGQPVQVQNSASQLEAEKATSADKVTDAVASEKTAETAANTEAAAQTDQEP	120
	*****.*****.*****.*.*****. .: * :*:*:***	
SK330	EEATTEKAAVAEEAKANATSETANTAAQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	180
SK1056	AEAATTEKAAVAEEAKAANATSETAKTAAQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	174
SK353	AEAATTEKAAVAEEAKAANATSETAKPEAAGQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	180
SK160	-EAATTEKAAVAEEAKAANATSETAKPEATNQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	178
SK36	-EAATTEKAAVAEEAKAANATSETAKPEATNQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	178
SK678	AEAATTEKAAVAEEAKAANATSETAKPEATNQDRQASPATADKQAKKTVTDKIVANPKVA	180
	*:*****.*****: * *****	
SK330	KKDRLPEPAQRQGAIAERMVAAQAQAAPVNTTEHDDVLSHIKTIIDGKKYYVQDGT	240
SK1056	KKDRLPEPAQRQGAIAERMVAAQAQAAPVNTTEHDDVLSHIKTIIDGKKYYVQDGT	234
SK353	KKDRLPEPAQRQGAIAERMVAAQAQAAPVNTTEHDDVLSHIKTIIDGKKYYVQDGT	240
SK160	KKDRLPEPAQRQGAIAERMVAAQAQAAPVNTTEHDDVLSHIKTIIDGKKYYVQDGT	238
SK36	KKDRLPEPAQRQGAIAERMVAAQAQAAPVNTTEHDDVLSHIKTIIDGKKYYVQDGT	238
SK678	KKDRLPEPAQRQGAIAERMVAAQAQAAPVNTTEHDDVLSHIKTIIDGKKYYVQDGT	240
	*****:*****:*****:*****	
SK330	FAVELNGKLYFDAETGALIDSAEYQFQQGTSSLNNEFTQKNAFHGTTEKDIETVDGYLT	300
SK1056	FAVELNGKLVLYFDAETGALIDSAEYQFQQGTSSLNNEFTQKNAFHGTTEKDIETVDGYLT	294
SK353	FAVELNGKLVLYFDAETGALIDSAEYQFQQGTSSLNNEFTQKNAFHGTTEKDIETVDGYLT	300
SK160	FAVELNGKLVLYFDAETGALIDSAEYQFQQGTSSLNNEFTQKNAFHGTTEKDIETVDGYLT	298
SK36	FAVELNGKLVLYFDAETGALIDSAEYQFQQGTSSLNNEFTQKNAFHGTTEKDIETVDGYLT	298
SK678	FAVELNGKLVLYFDAETGALIDSAEYQFQQGTSSLNNEFTQKNAFHGTTEKDIETVDGYLT	300
	*****:*****:*****:***:***:*.**:****	
SK330	ADSWYRPKILKDGKTWTSTETDLRPLLMAWWPKQTQVSYLNYMNQQGLGAGAFENKV	360
SK1056	ADSWYRPKILKDGKTWTSTETDLRPLLMAWWPKQTQVSYLNYMNQQGLGAGAFENKV	354
SK353	ADSWYRPKILKDGKTWTSTETDLRPLLMAWWPKQTQVSYLNYMNQQGLGAGAFENKV	360
SK160	ADSWYRPKILKDGKTWTSTETDLRPLLMAWWPKQTQVSYLNYMNQQGLGAGAFENKV	358
SK36	ADSWYRPKILKDGKTWTSTETDLRPLLMAWWPKQTQVSYLNYMNQQGLGAGAFENKV	358
SK678	ADSWYRPKILKDGKTWTSTETDLRPLLMAWWPKQTQVSYLNYMNQQGLGAGAFENKV	360
	***** ***** *****	
SK330	EQAILTGASQQVQRKIEERIGKGDGDKWLRRLMGAFVKTQPNWNIKTESETTGTNKDHLQ	420
SK1056	EQAILTGASQQVQRKIEERIGKGDGDKWLRRLMGAFVKTQPNWNIKTESETTGTNKDHLQ	414
SK353	EQAILTGASQQVQRKIEERIGKGDGDKWLRRLMGAFVKTQPNWNIKTESETTGTNKDHLQ	420
SK160	EQAILTGASQQVQRKIEERIGKGDGDKWLRRLMGAFVKTQPNWNIKTESETTGTNKDHLQ	418
SK36	EQAILTGASQQVQRKIEERIGKGDGDKWLRRLMGAFVKTQPNWNIKTESETTGTNKDHLQ	418
SK678	EQAILTGASQQVQRKIEERIGKGDGDKWLRRLMGAFVKTQPNWNIKTESETTGTNKDHLQ	420
	*****:*****:*****:*****	



SK330 YEGFSNFQDFATRDDQYTNKVI AKNVNLFKEWGVTSFELPPQYVSSQDGTFLDSIIQNGY 960  
 SK1056 YEGFSNFQDFATRDDQYTNKVI AKNVNLFKEWGVTSFELPPQYVSSQDGTFLDSIIQNGY 954  
 SK353 YEGFSNFQDFATRDDQYTNKVI AKNVNLFKEWGVTSFELPPQYVSSQDGTFLDSIIQNGY 960  
 SK160 YEGFSNFQDFATRDDQYTNKVI AKNVNLFKEWGVTSFELPPQYVSSQDGTFLDSIIQNGY 958  
 SK36 YEGFSNFQDFATRDDQYTNKVI AKNVNLFKEWGVTSFELPPQYVSSQDGTFLDSIIQNGY 958  
 SK678 YEGFSNFQDFATRDDQYTNKVI AKNVNLFKEWGVTSFELPPQYVSSQDGTFLDSIIQNGY 960  
 \*\*\*\*\*

SK330 AFEDRYDMAMSKNNKYGSLNDLLNALRALHSVNIQAIADWVPDQIYNLPGKEVVTATRNV 1020  
 SK1056 AFEDRYDMAMSKNNKYGSLNDLLNALRALHSVNIQAIADWVPDQIYNLPGKEVVTATRNV 1014  
 SK353 AFEDRYDMAMSKNNKYGSLNDLLNALRALHSVNIQAIADWVPDQIYNLPGKEVVTATRNV 1020  
 SK160 AFEDRYDMAMSKNNKYGSLNDLLNALRALHSVNIQAIADWVPDQIYNLPGKEVVTATRNV 1018  
 SK36 AFEDRYDMAMSKNNKYGSLNDLLNALRALHSVNIQAIADWVPDQIYNLPGKEVVTATRNV 1018  
 SK678 AFEDRYDMAMSKNNKYGSLNDLLNALRALHSVNIQAIADWVPDQIYNLPGKEVVTATRNV 1020  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SK330 NYGTYREGAEIKEKLYVANTRTNGTDYQKGYGGAFLDELKAKYPEIFERVQISNGQKMTT 1080  
 SK1056 NYGTYREGAEIKEKLYVANTRTNGTDYQKGYGGAFLDELKAKYPEIFERVQISNGQKMTT 1074  
 SK353 NYGTYREGAEIKEKLYVANTRTNGTDYQKGYGGAFLDELKAKYPEIFERVQISNGQKMTT 1080  
 SK160 NYGTYREGAEIKENLYVANTKTNGTDYQKGYGGVFLDELKAKYPEIFERVQISNGQKMTT 1078  
 SK36 NYGTYREGAEIKENLYVANTKTNGTDYQKGYGGVFLDELKAKYPEIFERVQISNGQKMTT 1078  
 SK678 NYGTYREGAEIKENLYVANTKTNGTDYQKGYGGVFLDELKAKYPEIFERVQISNGQKMTT 1080  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SK330 DEKITKWSAKHFNGTNI LGRGAYYVLKDWASNEYLNKNGEMVLPKQLVKNKASTGFVSD 1140  
 SK1056 DEKITKWSAKHFNGTNI LGRGAYYVLKDWASNEYLNKNGEMVLPKQLVKNKNAYTGFVSD 1134  
 SK353 DEKITKWSAKHFNGTNI LGRGAYYVLKDWASNEYLNKNGEMVLPKQLVKNKNAYTGFVKD 1140  
 SK160 DEKITKWSAKHFNGTNI LGRGAYYVLKDWASNEYLNKNGEMVLPKQLVKNKNAYTGFVKD 1138  
 SK36 DEKITKWSAKHFNGTNI LGRGAYYVLKDWASNEYLNKNGEMVLPKQLVKNKNAYTGFVKD 1138  
 SK678 DEKITKWSAKHFNGTNI LGRGAYYVLKDWASNEYLNKNGEMVLPKQLVKNKNAYTGFVKD 1140  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SK330 ASGTKYYSTSGYQARNSFIQDENGWYFDFKRGYLATGAHEIDGKQVYFLKNGIQLRDSL 1200  
 SK1056 ASGTKYYSTSGYQARNSFIQDENGWYFDFKRGYLATGAHEIDGKQVYFLKNGIQLRDSL 1194  
 SK353 TTGFKYYSTSGYQARNSFIQDENGWYFDFKRGYLATGAHEIDGKQVYFLKNGIQLRDSL 1200  
 SK160 TTGFKYYSTSGYQARNSFIQDENGWYFDFKRGYLATGAHEIDGKQVYFLKNGIQLRDSL 1198  
 SK36 TTGFKYYSTSGYQARNSFIQDENGWYFDFKRGYLATGAHEIDGKQVYFLKNGIQLRDSL 1198  
 SK678 TTGFKYYSTSGYQARNSFIQDENGWYFDFKRGYLATGAHEIDGKQVYFLKNGIQLRDSL 1200  
 ::\* \*\*\*\*\*:.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SK330 REDENGNQYYDKTGAQILNRYTDDGQNWRYFDAKGMARGLVTMGGNQFFDQNGYQV 1260  
 SK1056 REDENGNQYYDKTGAQILNRYTDDGQNWRYFDAKGMARGLVTMGGNQFFDQNGYQV 1254  
 SK353 REDENGNQYYDKTGAQILNRYTDDGQNWRYFDAKGMARGLVTMGGNQFFDQNGYQV 1260  
 SK160 REDENGNQYYDKTGAQILNRYTDDGQNWRYFDAKGMARGLVTMGGNQFFDQNGYQV 1258  
 SK36 REDENGNQYYDKTGAQILNRYTDDGQNWRYFDAKGMARGLVTMGGNQFFDQNGYQV 1258  
 SK678 REDENGNQYYDKTGAQILNRYTDDGQNWRYFDAKGMARGLVTMGGNQFFDQNGYQV 1260  
 \*\*\*\*\*:.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SK330 KGKIARAKDGKLRFDKDSGNAAANRFAQGDNPSPDWYFAGDGVAVTGLQKLGQQTLYFD 1320  
 SK1056 KGKIARAKDGKLRFDKDSGNAAANRFAQGDNPSPDWYFAGDGVAVTGLQKLGQQTLYFD 1314  
 SK353 KGKIARAKDGKLRFDKDSGNAAANRFAQGDNPSPDWYFAGDGVAVTGLQKLGQQTLYFD 1320  
 SK160 KGKIARAKDGKLRFDKDSGNAAANRFAQGDNPSPDWYFAGDGVAVTGLQKLGQQTLYFD 1318  
 SK36 KGKIARAKDGKLRFDKDSGNAAANRFAQGDNPSPDWYFAGDGVAVTGLQKLGQQTLYFD 1318  
 SK678 KGKIARAKDGKLRFDKDSGNAAANRFAQGDNPSPDWYFAGDGVAVTGLQKLGQQTLYFD 1320  
 \*\*\*\*\*

SK330 QDQKQVKGKIVTLADKSI RYFDANS GEMAVGKFAEGSKNEWYFDQAGKAVTGLQKIGQQ 1380  
 SK1056 QDQKQVKGKIVTLADKSI RYFDANS GEMAVGKFAEGSKNEWYFDQAGKAVTGLQKIGQQ 1374  
 SK353 QDQKQVKGKIVTLADKSI RYFDANS GEMAVGKFAEGSKNEWYFDQAGKAVTGLQKIGQQ 1380  
 SK160 QDQKQVKGKIVTLADKSI RYFDANS GEMAVGKFAEGSKNEWYFDQAGKAVTGLQKIGQQ 1378  
 SK36 QDQKQVKGKIVTLADKSI RYFDANS GEMAVGKFAEGSKNEWYFDQAGKAVTGLQKIGQQ 1378  
 SK678 QDQKQVKGKIVTLADKSI RYFDANS GEMAVGKFAEGSKNEWYFDQAGKAVTGLQKIGQQ 1380  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SK330	TLYFDQDGKQVKGKVVTLADKTIRYFDANSGEMAVGKFAEGAKNEWYYFDQ	1440
SK1056	TLYFDQDGKQVKGKVVTLADKSIIRYFDANSGEMAVGKFAEGAKNEWYYFDQAGKAVTGLQ	1434
SK353	TLYFDQDGKQVKGKVVTLADKSIIRYFDANSGEMAVGKFAEGAKNEWYYFDQAGKAVTGLQ	1440
SK160	TLYFDQDGKQVKGKVVTLADKSIIRYFDANSGEMAVGKFAEGAKNEWYYFDQAGKAVTGLQ	1438
SK36	TLYFDQDGKQVKGKVVTLADKTIRYFDANSGEMAVGKFAEGAKNEWYYFDQAGKAVTGLQ	1438
SK678	TLYFDQDGKQVKGKVVTLADKTIRYFDANSGEMAVGKFAEGAKNEWYYFDQAGKAVTGLQ	1440
	*****:*****.*****.*****	
SK330	KIGQQTLYFDQ	1500
SK1056	KIGQQTLYFDQNGKQVKGQLVTLADKSIIRYFDANSGEMAANKFVEGAKNEWYYFDQAGKA	1494
SK353	KIGQQTLYFDQNGKQVKGQLVTLADKSIIRYFDANSGEMAANKFVEGAKNEWYYFDQAGKA	1500
SK160	KIGQQTLYFDQNGKQVKGQLVTLADKSIIRYFDANSGEMAANKFVEGAKNEWYYFDQAGKA	1498
SK36	KIGQQTLYFDQNGKQVKGQLVTLADKSIIRYFDANSGEMAANKFVEGAKNEWYYFDQAGKA	1498
SK678	KIGQQTLYFDQNGKQVKGQLVTLADKSIIRYFDANSGEMAANKFVEGAKNEWYYFDQAGKA	1500
	*****:*****.*****:***	
SK330	VTGLQQIGQQTLYFDQNGKQVKGKIVYVNGANRYFDANSGEMARNKWIQLEDGSWMYFDR	1560
SK1056	VTGLQQIGQQTLYFDQNGKQVKGKIVYVNGANRYFDANSGEMARNKWIQLEDGSWMYFDR	1554
SK353	VTGLQQIGQQTLYFDQNGKQVKGKIVYVNGANRYFDANSGEMARNKWIQLEDGSWMYFDR	1560
SK160	VTGLQQIGQQTLYFDQNGKQVKGKIVYVNGANRYFDANSGEMARNKWIQLEDGSWMYFDR	1558
SK36	VTGLQQIGQQTLYFDQNGKQVKGKIVYVNGANRYFDANSGEMARNKWIQLEDGSWMYFDR	1558
SK678	VTGLQQIGQQTLYFDQNGKQVKGKIVYVNGANRYFDANSGEMARNKWIQLEDGSWMYFDR	1560
	*****:***** *****	
SK330	NGRGRRFGWN	1570
SK1056	NGRGRRFGWN	1564
SK353	NGRGRRFGWN	1570
SK160	NGRGRRFGWN	1568
SK36	NGRGRRFGWN	1568
SK678	NGRGRRFGWN	1570
	*****	

## ANEXOS

### Anexo 1 - Verificação de originalidade e prevenção de plágio

#### Tese de Doutorado VAAF

##### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

<b>20%</b> ÍNDICE DE SEMELHANÇA	<b>19%</b> FONTES DA INTERNET	<b>4%</b> PUBLICAÇÕES	<b>5%</b> DOCUMENTOS DOS ALUNOS
------------------------------------	----------------------------------	--------------------------	------------------------------------

##### FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>12%</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Universidade Estadual de Campinas</b> Documento do Aluno	<b>3%</b>
<b>3</b>	<b>www.prp.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>4</b>	<b>livros01.livrosgratis.com.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<b>repositorio.ufmg.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>qdoc.tips</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>teses.usp.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>repositorio.unb.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	<b>app.uff.br</b> Fonte da Internet	

## Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
Comissão Interna de Biosegurança



OF-CIBio-007/2019

Piracicaba, 21 de outubro de 2019.

Pesquisador responsável: **Renata de Oliveira Mattos Graner**

Prezado Professor,

Informamos que seu Requerimento de Autorização nº **003/2019**, para Atividades em Contenção com OGM e seus Derivados, para realização do projeto intitulado "Análises da participação dos genes envolvidos na produção de DNA extracelular e exopolissacarídeos na formação de biofilmes por *Streptococcus sanguinis*", foi analisado e aprovado pela CIBio – FOP/Unicamp. Este projeto deverá ser executado nos laboratórios credenciados para trabalho com OGM e derivados e durante o período de vigência estabelecido, conforme o requerimento aprovado.

Informamos que como responsável por este projeto, estará sob sua responsabilidade:

1. Assegurar a plena capacitação da equipe de trabalho e o cumprimento das resoluções normativas da CTNBio.
2. Manter toda a documentação sobre o projeto e sobre a capacitação da equipe de trabalho em arquivo de pronto acesso, para visitas e inspeções pela CIBio – FOP/Unicamp e/ou órgãos competentes.
3. Comunicar à CIBio-FOP/Unicamp através de novo requerimento, eventuais alterações no projeto, na equipe de trabalho ou de seu local de realização.
4. Encaminhar à CIBio-FOP/Unicamp, o relatório das atividades deste projeto em formulário específico no dia 01 de fevereiro de cada ano e/ou quando do encerramento do projeto.

Atenciosamente,

Profa. Renata de Oliveira Mattos Graner  
Presidente CIBio – FOP/UNICAMP  
e-mail: [rmgraner@fop.unicamp.br](mailto:rmgraner@fop.unicamp.br)  
Tel. 19 2106 5379