

**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**GEOVANNY NILTON CUYA SALVATIERRA**

**ANÁLISE DAS FUNÇÕES DO GENE *SSA\_0094* EM *STREPTOCOCCUS SANGUINIS***

Piracicaba

2024

# **GEOVANNY NILTON CUYA SALVATIERRA**

## **ANÁLISE DAS FUNÇÕES DO GENE *SSA\_0094* EM *STREPTOCOCCUS SANGUINIS*.**

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.

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lívia Araújo Alves.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Geovanny Nilton Cuya Salvatierra e orientada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata de Oliveira Mattos-Graner.

Piracicaba

2024

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

C99a Cuya-Salvatierra, Geovanny Nilton, 1989-  
Análise das funções do gene *SSA\_0094* em *Streptococcus sanguinis* /  
Geovanny Nilton Cuya Salvatierra. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Renata de Oliveira Mattos Graner.  
Coorientador(es): Lívia Araujo Alves.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP).

1. *Streptococcus sanguinis*. 2. Parede celular. 3. Hidrofobicidade. 4.  
Biofilmes. 5. Saliva. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira, 1971-. II. Alves,  
Lívia Araujo, 1988-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP). IV. Título.

Informações complementares

**Título em outro idioma:** Analysis of the functions of the *SSA\_0094* gene in  
*Streptococcus sanguinis*

**Palavras-chave em inglês:**

*Streptococcus sanguinis*

Cell wall

Hydrophobicity

Biofilms

Saliva

**Área de concentração:** Microbiologia e Imunologia

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

**Banca examinadora:**

Renata de Oliveira Mattos Graner [Orientador]

Maira Terra Garcia

Juliana Campos Junqueira

Marlise Inez Klein Furlan

Antônio Pedro Ricomini Filho

**Data de defesa:** 07-10-2024

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

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8169-7230>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5135710790093907>



**UNICAMP**

**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 07 de 10 de 2024, considerou o candidato GEOVANNY NILTON CUYA SALVATIERRA aprovado.

PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata de Oliveira Mattos Graner

PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maira Terra Garcia

PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Campos Junqueira

PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marlise Inez Klein Furlan

PROF. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho

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,**

A minha mãe que está no céu, muito obrigado por tudo querida mãe, serei grato contigo minha vida inteira, obrigada por me dar a vida e estar sempre presente nela, você sempre foi meu grande modelo a seguir e obrigada para me tornar uma pessoa de bem, os conselhos que me deste fizeram que me torne cada dia melhor pessoa, os dias não são os mesmos sem você, sinto muita falta de você. Agradeço a Deus por me permitir compartilhar trinta e quatro anos da minha vida com uma pessoa boa e digna de admiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai, Nicolas Cuya Arango, obrigado por cuidar sempre de mim, por estar presente neste caminho, serei grato por todo o apoio recebido enquanto estive no Brasil e por me entender sempre.

À Maria Martinez Belmonte, minha esposa e companheira de vida, fonte de amor e carinho, obrigado por me acompanhar em este caminho tão longo e por trazer uma bela criatura em nossas vidas, obrigado pela paz e compressão que me dás.

A meu irmão Brian Youssef Cuya Salvatierra, quem sempre esteve, quando precisei mais de alguém, obrigado por me ajudar em todo o tempo que estive no hospital foi você quem cuidou de mim, me acompanhou neste longo processo de recuperação e esteve presente quando mais precisava de você, obrigado por estar sempre presente na minha vida.

Aos meus irmãos Herberth Nicolas Cuya Salvatierra, Wilder Elvis Cuya Salvatierra, os quais são minha família, sinto-me abençoado por tê-los, são os melhores irmãos e amo vocês com todo o meu coração. Aos meus sobrinhos Nicole, Nicolas, Megan, André, Zaret e ao meu querido sobrinho e afiliado Rodrigo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner, muito obrigado pela grande paciência em todos estes anos de estudo, obrigado por me incentivar sempre e estar presente neste longo caminho da investigação, sempre você me ajudou a melhorar, sempre me incentivou a ser um melhor profissional, estou muito grato com você por toda a aprendizagem e pela oportunidade de fazer parte deste grupo maravilhoso de pesquisadores na microbiologia, obrigado por tudo professora, você é uma pessoa muito admirável e uma grande pesquisadora.

Aos meus amigos de laboratório. Ao Victor Aragão Abreu de Freitas, o meu parceiro na microbiologia, foram bons momentos compartilhados dentro e fora do laboratório; obrigado

pela amizade e por me ouvir muitas vezes. Ao Eduardo Martinelli, companheiro de bancada e amigo, obrigado por seus conselhos e pelos momentos compartilhados. Ao meu amigo Hassan Nadved, tenho apenas que agradecer imensamente a você, pela companhia durante toda a pandemia, por todos esses momentos compartilhados em casa como uma família junto ao Jhon Yaranga e Gustavo Oliveira, fico muito grato pela ajuda que me brindou todo este tempo e sobretudo quando rompi o tendão de Aquiles, você é a melhor pessoa que conheci na minha vida, obrigado pela sua amizade Hassanzinho.

Aos meus amigos da microbiologia, à Valéria, pelo auxílio técnico, Janaina Barbosa, Simone Busato, Flavia Maia, Mateus Cardoso, Mariana Gomes, Mariane, agradeço-lhes pela amizade e pelos momentos juntos.

A todos os meus amigos do Brasil: Giovani Fogalli, Camila Meneses, Gustavo Raphael Oliveira, João Pedro Sossai, Rodolfo Figueiredo, Amanda Mazzaro, Dielia Giomo, Fernanda di Honòri, Thalia Castelo, Isabela de Souza e Alana Vittorio os quais formam minha família aqui no Brasil, pessoas muito boas que tive o prazer de conhecer, considero-me abençoado por tê-los como amigos. E também a todos meus amigos peruanos no Brasil, esta estadia não teria sido a mesma sem vocês: Jhonny Burga, Rosa Abuhadba, Milagros Falcon, grandes pessoas e amigos, serei sempre grato por todos os conselhos e pela amizade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/02054-4.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP/FOP) pela oportunidade concedida.

## RESUMO

*Streptococcus sanguinis* é uma espécie comensal abundante na microbiota bucal capaz de iniciar a colonização dos dentes, mas frequentemente associada a infecções cardiovasculares oportunistas. Esta espécie utiliza o sistema de dois componentes (SDC) VicRK para regular genes envolvidos na produção de peróxido de hidrogênio, homeostase da parede celular e formação de biofilmes. Um dos genes alvo de VicRK ainda com função desconhecida, *ssa\_0094*, é fortemente induzido por este SDC na cepa SK36. O objetivo deste estudo foi investigar a contribuição de *ssa\_0094* para a biogênese da parede celular, formação de biofilme e outros fenótipos associados à persistência de *S. sanguinis* em sítios bucais e extra-bucais. Para isso, uma cepa mutante isogênica de *ssa\_0094*, foi obtida a partir da cepa *S. sanguinis* SK36 (SK0094), as cepas foram analisadas quanto ao padrão de crescimento planctônico e em biofilmes, à morfologia da parede celular, hidrofobicidade de superfície e perfil de autólise, agregação celular mediada por sacarose, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de eDNA, assim como quanto à persistência *ex vivo* em sangue humano. Os dados obtidos sugerem que, nas condições experimentais utilizadas, *ssa\_0094* tem modesta influência na formação de biofilmes e na estrutura da parede celular, embora possa contribuir para o aumento na produção de eDNA de forma independente da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, *ssa\_0094* parece influenciar a hidrofobicidade sob força iônica compatível com o plasma, além de ser requerido para a persistência em sangue humano. Estes resultados sugerem que *ssa\_0094* pode ser importante para a sobrevivência de *S. sanguinis* em sítios extra-orais, ressaltando a necessidade de estudos mais detalhados sobre o papel deste gene na persistência desta espécie no sistema cardiovascular.

Palavras-chave: *Streptococcus sanguinis*, parede celular, domínio LysM, hidrofobicidade, biofilme, saliva, DNA extracelular (eDNA), exopolissacarídeos, piruvato oxidase, glucosiltransferase, virulência.

## ABSTRACT

*Streptococcus sanguinis* is an abundant commensal species in the human oral microbiota capable of initiating the colonization of teeth, but frequently associated with opportunistic infections of the cardiovascular system. This species relies on the two-component system (TCS) VicRK to regulate genes involved in hydrogen peroxide production, cell wall homeostasis and biofilm formation. One of the VicRK target genes with still unknown function, *ssa\_0094*, is strongly induced by this SDC in the SK36 strain. The aim of this study was to investigate the contribution of *ssa\_0094* to cell wall morphology, biofilm formation and other phenotypes associated with *S. sanguinis* persistence in oral and extra-oral site. To this end, an isogenic mutant of *ssa\_0094* was obtained from SK36 (SK0094) and subjected to phenotypic screening in comparisons with SK36 under different culture conditions. Profiles of planktonic and biofilm growth, cell wall morphology, surface hydrophobicity and autolysis, sucrose-mediated cell aggregation, production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and eDNA as well as *ex vivo* persistence in human blood were assessed. A mutant complemented with an episomal copy of *ssa\_0094* was used as a control. The data obtained suggest that, under the experimental conditions used, *ssa\_0094* has a modest influence on biofilm formation and cell wall structure, although it may contribute to increased eDNA production independently of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. On the other hand, *ssa\_0094* appears to influence on the surface hydrophobicity under plasma-compatible ionic strengths and are required for *S. sanguinis* persistence in human blood. These results suggest that *ssa\_0094* may be important for the survival of *S. sanguinis* in extra-oral sites, highlighting the need for additional studies to explore the roles of this gene in *S. sanguinis* persistence in the cardiovascular system.

Keywords: *Streptococcus sanguinis*, cell wall, LysM domain, hydrophobicity, biofilm, saliva, extracellular DNA (eDNA), exopolysaccharides, pyruvate oxidase, glucosyltransferase, virulence.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Morfologia das cepas *S. sanguinis* SK36, SK0094, SK0094+ nas fases iniciais de formação de biofilmes, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....37
- Figura 2:** Biomassa de biofilmes em estágios iniciais por cepas *S. sanguinis* SK36, SK0094, SK0094+ em placas de 96 poços contendo meio BHI com 1% de sacarose, em 10% de CO<sub>2</sub>.....38
- Figura 3:** Análise da agregação bacteriana de cepas de *S. sanguinis* SK36, SK0094, SK0094+, na presença de sacarose, em culturas com meio MQD com 1% de sacarose e sem sacarose foram fotografados antes e após agitação por 10 seg, em vórtex .....38
- Figura 4:** Cinética de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e eDNA por cepas *S. sanguinis* SK36, SK0094, SK0094+.....40
- Figura 5:** Perfis de autólise e hidrofobicidade de superfície das cepas *S. sanguinis* SK36, SK0094 e SK0094+, para monitoramento da autólise por até 84h.....42
- Figura 6:** Análise de MET da estrutura da parede celular de cepas *S. sanguinis*. As cepas SK36 SK0094 e SK0094+ em atmosfera aeróbia com 10% de CO<sub>2</sub>.....43
- Figura 7:** Persistência *ex vivo* de cepas *S. sanguinis* em sangue humano. As cepas SK36, SK0094 e SK0094+ incubadas sob agitação orbital leve, para monitoramento das contagens de bactérias viáveis logo após a suspensão (tempo 0h) e até 60 h de incubação.....44

## LISTA DE TABELAS (opcional)

<b>Tabela 1:</b> Cepas estudadas na pesquisa .....	29
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ADOTADAS

<b>A<sub>550nm</sub></b>	: Absorbância no comprimento de onda de 550 nanômetros.
<b>A<sub>575nm</sub></b>	: Absorbância no comprimento de onda de 575 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 10% de saliva humana.
<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>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>gDNA</b>	: DNA genômico.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Peróxido de hidrogênio.
<b>mL</b>	: Mililitro.
<b>mM</b>	: Milimolar.

<b>NaCl</b>	: Cloreto de sódio.
<b>PA</b>	: Película Adquirida.
<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>pDNA</b>	: DNA plasmidial.
<b>PECs</b>	: Polissacarídeos extracelulares.
<b>pH</b>	: Potencial hidrogênico.
<b>qPCR</b>	: PCR em tempo real quantitativa.
<b>qRT-PCR</b>	: Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa.
<b>RCF</b>	: Unidade de força centrífuga relativa (de <u>R</u> elative <u>C</u> entrifugal <u>F</u> orce).
<b>RNA</b>	: Ácido ribonucleico (de <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid).
<b>RNA<sub>m</sub></b>	: Ácido ribonucléico mensageiro.
<b>RT</b>	: Transcrição reversa que dará origem a cDNA (de Reverse Transcription).
<b>qRT-PCR</b>	: RT-PCR quantitativa em tempo real.
<b>rpm</b>	: Rotações por minuto.
<b>Rcf</b>	: Unidade de força centrífuga relativa (RCF).
<b>SSA_0094</b>	: Gene envolvido na biossíntese da parede celular.
<b>spxB</b>	: Gene que induz a produção de peróxido de hidrogênio.
<b>gtfP</b>	: Gene envolvido na síntese de polissacarídeos.

- TA** : Temperatura ambiente.
- TCS** : Sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (de *Two Component System*).
- TE** : Tampão 10 mM tris, 1mM EDTA, pH 8.0
- THB** : Caldo Todd-Hewitt (de Todd- hewitt Broth)
- U** : Unidad (s).
- UV** : Radiação ultra-violeta.
- vicK*** : Gene codificador da proteína quinase sensora de superfície VicK (de Virulence Control Kinase).
- vicR*** : Gene codificador da proteína reguladora VicR (de Virulence Control Regulator).
- µg** : Micrograma
- 10% CO<sub>2</sub>** : Pressão parcial de carbono a 10%.
- 16S RNAr** : Gene codificador do RNA ribossômico 16S.
- SSA\_0094** : Cepa mutante, gene inativado ssa\_0094 a partir da cepa de referência SK36.
- SSA\_0094+** : Cepa complementada.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	66
Anexo 1 - Relatório de verificação de originalidade e prevenção de plágio	66
Anexo 2 - Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	67
Anexo 3 – Comprovante de aprovação da Comissão Interna de Biossegurança da FOP/UNICAMP (CIBio- FOP/UNICAMP)	80

## 1. INTRODUÇÃO

A despeito da grande importância de *S. sanguinis* para a ecologia dos biofilmes dentários e como patógeno oportunista de infecções cardiovasculares, os mecanismos moleculares de formação de biofilmes e de virulência sistêmica utilizados por esta espécie ainda precisam ser melhor compreendidos (Zhu et al., 2018; Nobbs & Kreth, 2019). É possível que cepas de *S. sanguinis* respondam diferentemente a estímulos dos sítios bucais e extra-orais expressando padrões gênicos distintos que modulam seu comportamento como microrganismo comensal ou patogênico, o que explicaria a alta diversidade de fenótipos de formação de biofilmes e de virulência sistêmica, observados nesta espécie (Baker et al., 2018; Alves et al., 2022). Um dos recursos mais utilizados por bactérias para ajustes dos seus transcriptomas em resposta a diferentes estímulos ambientais consiste nos sistemas de transdução de sinal de dois componentes (SDC), os quais são formados basicamente por uma proteína sensora de membrana e um fator de transcrição cognato (regulador de resposta) intracitoplasmático. A proteína sensora ativada por sinais ambientais específicos ativa o RR cognato, o qual pode então reprimir ou ativar a expressão dos genes alvo requeridos para uma resposta fisiológica adequada.

Cepas *S. sanguinis* apresentam no seu genoma um total de cerca 14 SDC. Estes incluem um SDC altamente conservado entre bactérias Gram-positivas, conhecido como sistema VicRK (Vic de *virulence control*). Em estudos prévios do nosso grupo sobre o papel de VicRK na biologia de *S. sanguinis*, verificamos que VicRK regula funções chave para a colonização competitiva de *S. sanguinis*, incluindo-se genes para a conversão de O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para a inibição de *S. mutans* e *P. gingivalis* e liberação de eDNA durante as fases iniciais de formação de biofilmes, e para a ligação a exopolissacarídeos sintetizados a partir da sacarose (incluindo-se *spxB* e *gpbB*). Curiosamente um gene anotado no genoma da cepa *S. sanguinis* SK36 como *ssa\_0094* foi detectado como fortemente regulado por VicRK e demonstrou transcrição aumentada durante o crescimento de *S. sanguinis* em

biofilmes, quando comparado ao crescimento plactônico (Moraes et al., 2014). Estes dados despertaram nosso interesse na caracterização funcional deste gene e investigação da contribuição do mesmo para fenótipos de virulência.

Nossas análises *in silico* de *ssa\_0094* revelaram que este gene codifica uma proteína altamente conservada (SSA\_0094) entre cepas *S. sanguinis* a qual contém um domínio LysM comumente encontrado em proteínas com funções diversas que se ligam não covalentemente ao peptidoglicano e também a componentes glicídicos de glicoproteínas do soro e matriz extracelular humanas (Buist et al., 2008; Visweswaran et al., 2014; Hirschhausen et al., 2012). Outra característica interessante de SSA\_0094 é que proteínas com alta homologia são detectadas apenas em *S. gordonii*, enquanto cepas das espécies *S. cristatus* e *S. mutans* não apresentam ortólogos. Portanto, neste estudo procuramos investigar as funções específicas desse gene, na formação de biofilme, biogênese da parede celular e na virulência sistêmica de *S. sanguinis*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Streptococcus sanguinis* como membro comensal abundante do microbioma bucal

O Projeto do Microbioma Humano (PMH) revelou que o microbioma oral é a segunda maior microbiota do corpo humano, depois do microbioma gastrointestinal (PMC, 2012), sendo composto por aproximadamente 774 espécies (HOMD; <https://www.homd.org/>). O microbioma humano co-evoluiu e co-existe em uma relação de harmonia com nosso organismo, apresentando diversas funções benéficas para a manutenção da saúde, entre elas, suporte nas funções de defesa do hospedeiro e resistência à colonização de patógenos (Kilian et al., 2016; Verma et al., 2018). O gênero *Streptococcus*, pertencente ao filo *Firmicutes*, está presente em grande abundância na cavidade oral (Nobbs & Kreth.,2019). A classificação taxonômica das espécies de estreptococos do microbioma humano é complexa e sujeita a contínuas revisões. Atualmente, os estreptococos identificados em humanos estão classificados em oito grupos taxonômicos (grupos Anginosus, Bovis, Downeii, Mitis, Mutans, Salivarius, Pyogenic e Sanguinis), além de um grupo ainda indefinido contendo espécies patogênicas (Baty et al., 2022). O grupo Sanguinis inclui três espécies, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus cristatus*). A espécie *S. sanguinis* é frequentemente relacionada à manutenção da saúde bucal, sendo pioneira na colonização dos dentes. A aquisição de *S. sanguinis* ocorre nos primeiros meses de vida, especialmente a partir da erupção dos primeiros dentes decíduos por volta dos 6 a 8 meses de idade (Carlsson et al., 1970; Caufield et al., 2001), sendo que esta espécie continua abundante em diferentes sítios bucais, em especial os dentes, durante toda a vida adulta.

Como membro pioneiro dos dentes, *S. sanguinis* modula a colonização dos dentes influenciando na colonização de espécies sucessoras, através de produção de substâncias inibitórias

que controlam reduções do pH local e/ou inibem espécies patogênicas, induzindo a liberação de eDNA e consumindo o oxigênio, o qual é mais abundante nas fases iniciais de colonização (Kreth et al., 2017; Zhu et al., 2019). Devido sua capacidade de competir e inibir a colonização por espécies patogênicas como *S. mutans* (patógeno da cárie dentária) e *Porphyromonas gingivalis* (patógeno da doença periodontal), *S. sanguinis* é comumente referida como uma espécie bucal benéfica. Entretanto, *S. sanguinis* também está frequentemente associada à endocardite infecciosa (EI) (Nobbs & Kreth, 2019), sendo sua nomenclatura original, *Streptococcus sanguis* (posteriormente adequada gramaticalmente para “*sanguinis*”) derivada de seu sítio de isolamento original, a corrente sanguínea de pacientes com EI; do Latim “*sanguis*” significa “sangue” (White & Niven, 1946).

### **2.1. Mecanismos de formação de biofilmes por *S. sanguinis***

Como membro pioneiro das superfícies dentárias e membro constituinte abundante em biofilmes maduros, *S. sanguinis* possivelmente aplica diferentes mecanismos para iniciar a colonização dos dentes, interagir com espécies microbianas sucessoras e persistir em biofilmes maduros mais complexos, durante os repetidos ciclos de formação, desorganização e reformação dos biofilmes. Os estágios iniciais de colonização dentária ocorrem sob maior tensão de oxigênio e são fortemente dependentes de interações específicas de componentes de superfície de *S. sanguinis* com componentes da película adquirida do esmalte, a qual é formada por componentes salivares e teciduais do hospedeiro, além de componentes de origem microbiana. Componentes abundantes da película adquirida incluem pelo menos cerca de 50 proteínas presentes em todos os estágios de formação da película. Entre os componentes principais encontramos a histatina 1, estaterina, PRP1, amilase, MUC5B, lisozima e a lactoperoxidase, que demonstraram um aumento significativo conforme a maturação da película adquirida do esmalte *in vivo* (Lee et al., 2013). Para interagir com a película

adquirida, *S. sanguinis* utiliza fímbrias e adesinas para se aderir às superfícies dos dentes e iniciar a formação dos biofilmes. (Zhu et al., 2018).

Para enfrentar o estresse oxidativo gerado pela maior tensão de O<sub>2</sub> das superfícies dentárias ainda em colonização, *S. sanguinis* também expressa a enzima piruvato oxidase (SpxB, codificada por *spxB*). Esta enzima converte piruvato, fostafo inorgânico e O<sub>2</sub> em acetil-fosfato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (Kreth et al., 2017). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inibe o crescimento de espécies não produtoras de SpxB, como *S. mutans* e *P. gingivalis* (Kreth et al., 2005; Herrero et al., 2016). Outras espécies comensais de estreptococos são capazes também de expressar SpxB (Zhu et al., 2014). A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainda promove a morte

celular programada de uma pequena porcentagem da população microbiana (estimada em cerca de 10%) e consequente, a liberação de eDNA, um polímero importante para as fases iniciais de formação de biofilme, como verificado *in vitro* em biofilmes formados por apenas 4h (Moraes et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos nas fases posteriores de formação de biofilmes são difíceis de avaliar, uma vez que nestas fases, *S. sanguinis* interage com diversas espécies microbianas e o perfil destas interações modula a intensidade de formação e a estrutura de biofilmes. Diferente de *S. mutans*, espécie produtora de glucanos altamente insolúveis derivados da sacarose (Bowen et al., 2011) a partir da expressão de um conjunto de três enzimas glucosiltransferas (GtfB, GtfC e GtfD), *S. sanguinis* expressa apenas uma glucosiltransferase (GtfP), cujo produto são glucanos muito menos estáveis, a despeito da identificação de uma proporção de ligações do tipo  $\alpha$ -1,3 predominante em glucanos mais insolúveis (Kropec et al., 2001). A espécie *S. sanguinis* também expressa pelo menos uma proteína ligadora de glucano altamente conservada entre estreptococos (GbpB), a qual possivelmente medeia a interação de *S. sanguinis* como glucanos insolúveis derivados de outras espécies, como ocorre com outros estreptococos comensais (Harth-Chu et al., 2019). Nestas fases entretanto, *S. sanguinis* pode

contribuir para o controle da população de microrganismos mais acidogênicos e acidúricos, através de suas atividades metabólicas. Por exemplo, *S. sanguinis* produz álcalis a partir do metabolismo da uréia e da arginina, através da expressão de sistema arginina deiminase. Assim, através de expressão deste sistema, *S. sanguinis* limita a acidogenicidade do biofilme em maturação, o que confere possivelmente maior competitividade frente a espécies adaptadas a pHs mais baixos, como por exemplo *S. mutans* (Zhu et al., 2018).

Além da produção de eDNA e de glucanos a partir da sacarose, *S. sanguinis* também produz fibras amilóides, outro tipo de exopolímero importante para a maturação de biofilmes (Franco et al., 2023). Não se sabe quais proteínas expressas por *S. sanguinis* estão envolvidas diretamente na polimerização e maturação de fibras amilóides, mas há evidências de que estas estão entre um grupo de cerca de trinta e três proteínas ancoradas covalentemente à parede celular pela enzima sortase A (Turner et al., 2003; Franco et al., 2023). Estas proteínas se caracterizam pela presença de um motivo C-terminal alvo da sortase A (LPxTG) e são particularmente abundantes na espécie *S. sanguinis* (Xu et al., 2007; Turner et al., 2009). Diferente de *S. sanguinis* por exemplo, a espécie *S. mutans* expressa apenas seis genes que codificam proteínas com o motivo LPxTG (Franco et al., 2023). Assim, uma outra característica particular de *S. sanguinis* é a presença no seu genoma de um número excepcional de proteínas de parede celular. Além de proteínas com motivo LPxTG, o genoma de *S. sanguinis* alberga genes que codificam sessenta lipoproteínas (Xu et al., 2007). Desta forma, os números de proteínas de superfície de *S. sanguinis* excedem drasticamente do número de proteínas expressar por outras espécies comensais e patogênicas de estreptococos, como *S. mutans* e *S. pneumoniae* (Xu et al., 2007). Este vasto arsenal de proteínas de superfície provavelmente contribua para a capacidade de *S. sanguinis* interagir com componentes salivares, além de favorecer sua interação com diversos microrganismos dos biofilmes dentários e com tecidos de sítios extra-orais (Alves et al., 2022).

## 2.2 Envolvimento de *S. sanguinis* em infecções cardiovasculares oportunistas

O estudo clássico de White & Niven (1946) reportando pela primeira vez o isolamento de *S. sanguinis* da corrente sanguínea de pacientes com endocardite infecciosa (EI) foi posteriormente reforçado por diversos estudos subsequentes associando esta espécie a casos de EI em indivíduos susceptíveis (von Reyn et al., 1981; Douglas et al., 1993; DiFilippo et al., 2005). Em casos raros, *S. sanguinis* pode causar IE severa em pacientes jovens saudáveis submetidos a tratamento ortodôntico (Rahman et al., 2023). O DNA genômico de *S. sanguinis* tem sido detectado em espécimes de válvulas cardíacas infectadas, assim como em placas ateromatosas, com frequência significativamente maior do que a de outras espécies de estreptococos bucais, com exceção de *S. mutans* e das espécies periodontopatogênicas *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Nakano et al., 2006; Nakano et al., 2009; Yoshida et al., 2023), sugerindo uma capacidade particular de *S. sanguinis* de persistir na corrente sanguínea, colonizar e infectar tecidos cardiovasculares. O rastreamento de fatores de virulência envolvidos nestes processos é, portanto, necessário.

Estudos do nosso grupo de pesquisa indicam que *S. sanguinis* tem menor susceptibilidade à ligação de IgG sérico e à ativação do sistema complemento, quando comparada a outras espécies de estreptococos bucais (Alves et al., 2019). Entretanto, há ainda pouca informação sobre fatores de escape desta espécie a fatores imunológicos. Recentemente, verificamos que *S. sanguinis* expressa proteases de proteínas do complemento para escapar à deposição de C3b, principal opsonina do complemento, assim como para a invasão de células endoteliais primárias de artéria coronária humana e virulência *in vivo* (Alves et al., 2023). Funções metabólicas envolvidas no metabolismo de purinas e transporte de metais também parecem requeridos para a adaptação às condições nutricionais do soro na ausência de fatores imunológicos termicamente lábeis, como o sistema complemento (Zhu et al., 2021). Compatível com nossos ensaios de viabilidade *ex vivo* em sangue, verificamos que *S. sanguinis*

apresenta boa capacidade de se adaptar e crescer em sangue humano após cerca de 4 a 42h de incubação (Alves et al., 2023; Franco et al., 2023). Outros fatores relacionados à capacidade de causar infecções cardiovasculares incluem SSA\_1099, uma megaproteína com domínio RTX tipicamente encontrado em adesinas capazes de se ligar a múltiplos ligantes, assim como a hidrolase de peptidoglicano Mur2 (Martini et al., 2020). A expressão do homólogo da proteína ligadora de glucano GbpB, assim como de outras proteínas de biogênese de parede celular (MurN) também foram associadas à capacidade de *S. sanguinis* promover agregação plaquetária, indicando potencial contribuição para infecções cardiovasculares (Martini et al., 2020). Desta forma, proteínas de biogênese da parede celular potencialmente participam da virulência sistêmica de *S. sanguinis*, incluindo-se aquelas reguladas pelo sistema de dois componentes VicRK, sistema regulador abordado nos tópicos 2.3 e 2.4, a seguir.

### **2.3 Diversidade na expressão de funções de virulência sistêmica entre cepas de *S. sanguinis*.**

A cepa SK36 de *S. sanguinis* foi uma das primeiras cepas de estreptococos bucais com genoma sequenciado (Xu et al., 2007). A estrutura genômica de SK36 revela outras particularidades desta espécie. Entre estas, o tamanho de cromossomo de 2.388.435 pb (cerca de 177 a 590kb maior do que de genomas de outros 21 estreptococos de outras espécies) e seu alto conteúdo de CG (43.4%), claramente superior ao conteúdo de CG de outros estreptococos, os quais variam de 35,6 a 39,7%) (Xu et al., 2007). O número de cepas *S. sanguinis* sob sequenciamento genômico aumentou significativamente de 2016 (total de 24 novas cepas em sequenciamento) (Kreth et al., 2016) para o ano corrente. Atualmente o GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/1345>) contém sequências parciais ou totais de 69 cepas das espécie *S. sanguinis* isoladas de humanos e de uma cepa isolada de boca de um

ção. Entre as cepas de humanos, quarenta e duas foram isoladas da cavidade bucal, cinco da garganta, uma do trato respiratório superior, onze do sangue e uma de tecido cardíaco. O sítio de isolamento de outras doze cepas em sequenciamento não foi definido no GenBank, embora estas incluam sete cepas isoladas de pacientes com EI. Apenas oito cepas (incluindo-se SK36) apresentam, entretanto o genoma completamente anotado e montado depositado no GenBank. Portanto, comparações genômicas entre cepas podem ser limitadas pela incompletude de algumas sequências. Estudos comparativos revelam entretanto, que genes para a formação de biofilmes (*gtfP* e de potenciais proteínas ligadoras de glucano, *sspC/D*) são altamente conservados entre cepas, assim como genes que codificam pili (*pilF/G/T* e *pilA/B/C*) e genes que contribuem para virulência sistêmica (Kreth et al., 2016; Martini et al., 2021). Os genes *gtfP* e *sspC/D* são diretamente regulados pelo sistema VicRK, um SDC altamente conservado entre bactérias Gam-positivas, o qual é essencial para a viabilidade celular de *S. sanguinis*, assim como para outras espécies de estreptococos (Moraes et al., 2014; Mattos-Graner & Duncan, 2017). O sistema VicRK regula outro gene essencial para a colonização dos dentes por *S. sanguinis* (*spxB*) (Moraes et al., 2014). Curiosamente este sistema regula fortemente um gene com função desconhecida anotado anteriormente com *ssa\_0094* (Moraes et al., 2014), designação usada no presente estudo.

Comparações genômicas entre cepas *S. sanguinis* tem detectado algumas diferenças quanto a presença de ilhas genômicas e profagos (Zheng et al., 2016). Entretanto, não foram detectadas diferenças genômicas ou genes especificamente presentes em cepas isoladas de sangue ou envolvidas em infecções cardiovasculares (Kreth et al., 2017; Zheng et al., 2016). Por outro lado, comparações fenotípicas entre cepas com genoma disponível no Genbank, indicam diferenças marcantes em fenótipos de formação de biofilmes na presença de sacarose e/ou saliva humana, na agregação mediada por glucanos, na susceptibilidade à ativação do sistema complemento e opsonofagocitose por neutrófilos de sangue periférico e invasão de células endoteliais primárias de artéria coronária

(Alves et al., 2022). Estas diferenças poderiam refletir variações nos perfis de expressão gênica entre cepas, como demonstrado em estudos comparando cepas de *S. mutans* isoladas de cavidade bucal e de infecções cardiovasculares (Alves et al., 2016; Alves et al., 2020). Diferenças nas atividades transcricionais e polimorfismos gênicos de reguladores de resposta de SDC que controlam a transcrição de genes de virulência, como CovR e VicRK, tem sido constantemente associadas à diferenças significativas nas atividades transcricionais de genes alvo importantes para a persistência nos tecidos do hospedeiro, escape a fatores imunológicos e resistência a antibióticos (Alves et al., 2016; Oliveira et al., 2021). Basicamente, os SDCs são formados por uma proteína sensora de membrana (uma histidina quinase que comumente pode atuar como fosfatase; HK) em por uma proteína intracelular cognata que funciona como fator de transcrição quando fosforilado ou defosforilado (designado regulador de resposta, RR). A proteína sensora HK sofre auto-fosfoliação ao ser ativada por um estímulo físico/químico ambiental, transferindo os grupos fosfatos ao RR cognato que ao ser fosforilado, muda de conformação e se dimeriza para ligar-se às sequências reguladoras dos genes alvo, os quais tem sua transcrição ativada ou reprimida (Mattos-Graner & Duncan, 2017). Polimorfismos dos genes de *vicK* afetando domínios funcionais de VicK foram detectados em cepas *S. mutans* associadas à maior cariogenicidade (Zhuang et al., 2018) e a infecções sistêmicas (Oliveira et al., 2021), o que reforça o papel de genes alvo de VicRK na virulência de estreptococos.

#### **2.4 Análises genéticas de *ssa\_0094* de *S. sanguinis***

Através de estudos anteriores, identificamos o gene *ssa\_0094* como regulado direta e fortemente pelo SDC VicRK (Moraes et al., 2014). Embora anotado originalmente no GenBank com o código *ssa\_0094*, este gene de 1.088 pb (localizado na posição de 95.485 a 96.582 no cromossomo de SK36) atualmente apresenta o número de acesso SSA\_RS00550 no GenBank

([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_009009.1?report=graph](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_009009.1?report=graph)). Em nossas análises *in silico*, verificamos que este gene codifica a proteína que designamos SSA\_0094 de 365 amino ácidos, a qual é conservada entre todas as cepas *S. sanguinis* com genoma disponível no GenBank (dados não mostrados). Análises dos domínios funcionais de SSA\_0094 utilizando a ferramenta SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl211heidelberg.de/>) (Letunic et al, 2018; Letunic et al., 202) revelaram que esta apresenta um peptídeo sinal de 25 aa, indicando que seja uma proteína de superfície e/ou secretada. SSA\_0094 apresenta ainda um domínio LysM (na posição dos aa 52 a 96), o qual é comum em diversas proteínas que se ligam ao peptideoglicano e a glicoproteínas.

O domínio LysM foi originalmente identificado na lisozima do bacteriófago  $\phi$ 29 de *Bacillus subtilis* e está presente em um grande número de proteínas de vírus, procariotos e eucariotos. Em bactérias, o domínio LysM é comum em hidrolases de peptideoglicano e/ou proteínas que se ligam não covalentemente ao peptideoglicano com diversas funções biológicas (Buist et al., 2008; Visweswaran et al., 2014), por ligar-se especificamente a regiões de N-acetilglicosamina. Há evidências também de que LysM se liga com alta afinidade a porções de açúcares das glicoproteínas de matriz extracelular, como a fibronectina, vitronectina e fibrinogênio, como reportado para o domínio LysM da adesina/autolisina Aaa de *Staphylococcus aureus* (Hirschhausen et al., 2012).

Em estudos prévios do nosso grupo, obtivemos uma cepa mutante isogênica de *ssa\_0094* a partir da cepa SK36 (Camargo, 2021). Esta cepa foi posteriormente complementada com cópia episomal de *ssa\_0094* clonada no plasmídeo pDL278, o qual foi capaz de restaurar a expressão de *ssa\_0094* (dados de análise de RT-qPCR não publicados). Estudos paralelos do nosso grupo encontram-se em andamento para investigar o efeito na deleção de *ssa\_0094* na ligação de *S. sanguinis* a diversas glicoproteínas humanas de matriz extracelular. Interessantemente, nossas análises de BLASTp, revelaram que SSA\_0094 é uma proteína pouco conservada entre diferentes espécies de estreptococos bucais. Ortólogos de *SSA\_0094* não estão presentes no genoma de cepas de *S. mutans* ou de

*Streptococcus cristatus*. Por outro lado, uma proteína com alta similaridade a SSA\_0094 (63,5% de identidade) foi detectada em *Streptococcus gordonii*. Identificamos ainda outras proteínas com menor grau de similaridade a SSA\_0094 em estreptococos da cavidade bucal e orofaringe, incluindo-se as espécies comensais *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius* (com identidades de 44,2 a 46,6%; 100 a 99% de sequências de amino ácidos alinhadas) e espécies patogênicas *Streptococcus pneumoniae* (99% de alinhamento; 49,9% de identidade), *Streptococcus pyogenes* (99% de alinhamento; 45,5% de identidade). Assim, a proteína SSA\_0094 está restrita às espécies *S. sanguinis* e *S. gordonii*, o que desperta o interesse na utilização de mesma como alvo terapêutico específico.

### 3. Proposição

O objetivo geral deste estudo foi investigar a contribuição do gene *ssa\_0094* de *Streptococcus sanguinis* para a formação de biofilme, biogênese da parede celular e para fenótipos associados à virulência sistêmica desta espécie.

#### 3.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos envolveram o rastreamento das alterações fenotípicas promovidas pela inativação do gene *ssa\_0094* na cepa referência SK36, gerando a mutante isogênica SK0094. A cepa mutante foi comparada com cepa parental e com a cepa mutante complementada com cópia episomal de *ssa\_0094* (designada SK0094+), através de:

- 3.1.1 Análises da biomassa de biofilmes formados por quatro horas em placas de poliestireno.
- 3.1.2 Análises da morfologia celular durante estágios iniciais de formação de biofilmes sobre superfícies de vidro recobertas com saliva humana, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- 3.1.3 Análise da agregação bacteriana na presença de polissacarídeos produzidos a partir da sacarose.
- 3.1.4 Análise da cinética de produção de eDNA através de ensaios de PCR quantitativo (qPCR) com primers específicos para o gene *16SrRNA*.
- 3.1.5 Análise da cinética de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de ensaios colorimétricos.
- 3.1.6 Análise das atividades autolíticas induzidas por alta temperatura.
- 3.1.7 Análise da hidrofobicidade de superfície medida pela aderência a hidrocarbonetos.
- 3.1.8 Análise da morfologia da parede celular por microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- 3.1.9 Análise da persistência em sangue humano, através de ensaios de viabilidade *ex vivo* em sangue humano.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas estudadas, plasmídeos e condições de crescimento.

A tabela 1 inclui todas as cepas incluídas neste estudo. A cepa de *S. sanguinis* SK36 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC), cujo genoma foi estudado e divulgado (Xu *et al.*, 2007). Esta cepa foi utilizada para a construção do mutante isogênico SK0094. O plasmídeo auto-replicativo pDL278 (o qual contém o gene de resistência à espectinomicina) foi utilizado na clonagem de *ssa\_0094*, gerando pDL278::*ssa\_0094*. Este último foi então transformado em SK0094 para gerar a cepa complementada SK0094+. As outras cepas de *S. sanguinis* incluídas no estudo foram cedidas pelo Prof. Dr. Mogens Kilian da Universidade de Aarhus, Dinamarca. A cepa *Streptococcus mutans* UA159 foi também utilizada como referência em diversos ensaios.

Para todos os experimentos, as cepas foram inoculadas pelo método de estriamento a partir de estoques congelados (a -20°C) em placas de Petri contendo BHI ágar, BHE (BHI ágar com eritromicina a 10 µg/ml) ou BHS (BHI ágar com espectinomicina a 200 µg/ml) e incubadas por 24-30 h a 37°C sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub>, respectivamente. A seguir, um total de 5 colônias destas culturas foram transferidos para tubos de ensaio com 5 ml de meio BHI, BHE ou BHS, os quais foram incubados nas mesmas condições durante 18h. Estas culturas tiveram as absorbâncias (A<sub>550nm</sub>) determinadas em espectrofotômetro e alíquotas equivalentes aos mesmo número de células inoculadas em meios de cultura BHI acrescidos ou não de 10% de saliva humana estéril (BHIS) e 1% de sacarose, para as diferentes análises de agregação bacteriana, formação de biofilmes iniciais, ou em BHI para análises da cinética de produção de eDNA ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sobrevivência *ex vivo* em sangue humano, hidrofobicidade, análises morfológicas ou de autólise. As culturas foram incubadas sob atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> ou em aerobiose (sob agitação).

Tabela 1. Cepas estudadas.

Cepa	Sítio de isolamento	Fonte e/ou referência
<i>Streptococcus sanguinis</i>		
SK36	Biofilme dental	ATCC; Xu <i>et al.</i> , 2007
SK0094	<i>ssa_0094::Erm<sup>r</sup></i>	Camargo, 2021
SK0094+	<i>ssa_0094::Erm<sup>r</sup>;pDL278::0094;Espec</i>	Camargo, 2021
<i>Streptococcus mutans</i>		
UA159	Isolada de criança com lesões de cáries ativas.	ATCC; Ajdic <i>et al.</i> , 2002

#### 4.2 Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As morfologias celulares das cepas estudadas foram analisadas através de MET. Para isto, as células foram crescidas a partir de estoques congelados e cultivadas em tubos com 5 ml de caldo BHI, BHE ou BHS por um período de 18h. Após isso, as culturas foram centrifugadas a (6.500 rpm x 5 min a 4°C), para coleta das células em microtubos, as quais foram imediatamente adicionadas de fixador de Karnovsky para fixação durante 24 h a 4°C. As amostras foram então incubadas com tetróxido de ósmio a 1% por cerca de 2 h. A seguir, as amostras foram lavadas por três vezes (5 min. por lavagem) com tampão fosfato de Sorensen (0,1 M, pH 7,2-7,4). As amostras foram então desidratadas com concentrações crescentes de acetona (30,50, 70, 90 e 100%; 5 min. cada) e infiltradas com resina Dr. Spurr. Após inclusão final em resina pura (a 60-70°C por 48 h), as amostras foram cortadas em ultra micrótomo, contrastadas com chumbo e uranila, e analisadas em microscópio de transmissão JEM 1400 JEOL disponível no CMI – FOP/UNICAMP.

### **4.3 Agregação bacteriana mediada por polissacarídeos extracelulares (PEC) produzidos a partir da sacarose.**

As análises de agregação bacteriana mediada por PEC foram realizadas como descrito em estudos anteriores (Alves *et al.*, 2016; Hart-Chú *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2022). Para isto, as cepas foram crescidas a partir de inóculos de um mesmo número de bactérias em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio BHI, BHE ou BHS, suplementados com 1% de sacarose e incubadas a 37°C por 18h, sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub>. A seguir, a agregação bacteriana mediada por PECs foi analisada visualmente para definição semi-quantitativa das intensidades de agregação. Os tubos foram então fotografados em um local escuro, sob fundo preto e luz branca para documentação. Como controles, foram utilizadas culturas em BHI não suplementado com sacarose, assim como culturas da cepa UA159, a qual apresenta clara agregação na presença de sacarose.

### **4.4 Análise da cinética de produção de eDNA.**

A análise da produção de eDNA foi realizada através de análise de qPCR com primer para o gene 16S RNAr conforme estudos anteriores (Moraes *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2022) em amostras coletadas em diferentes tempos de crescimento planctônico. Para isto, volumes de 1 mL de culturas crescidas aerobicamente foram coletadas em diferentes momentos (2, 4, 6, 8, 10, 24 e 42 h de incubação) e centrifugadas (16.000 x g, 4°C, 10 min) para obtenção dos sobrenadantes, os quais foram filtrados através de filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millex<sup>®</sup>-FG), para a remoção de células. Para as reações de qPCR, misturaram-se volumes de 1 µL dos sobrenadantes filtrados com 3,4 µL de água miliQ, 5 µL de mistura principal de PCR SYBR green Power (Life Technologies, EUA) e 0,3 µL de solução de cada primer (10 µM), para o gene *16S RNAr*. As condições de ciclo de qPCR foram 95°C durante 10 min., seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 58°C por 15 s e 72°C por 30 s. A concentração de DNA foi calculada com base nos valores médios do ciclo linear com base

em uma curva padrão de DNA genômico da cepa SK36 (obtida através de diluição seriada de 10 vezes com 0.03 a 300 ng/mL de DNA genômico de SK36). Amostras de meio BHI esterilizado foram utilizadas como controles negativos das reações de qPCR. Três experimentos independentes realizados em duplicata para cada cepa analisada.

#### **4.5 Análises da cinética de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ensaios colorimétricos.**

A cinética de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em culturas planctônicas de SK36, SK0094 e SK0094+ foi determinada coletando amostras em diferentes momentos durante o crescimento planctônico, de acordo com métodos reportados em estudos anteriores (Kreth *et al.*, 2008; Camargo *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2022), com algumas modificações. Para isto, as cepas foram cultivadas a partir de inóculos padronizados em frascos de vidro contendo 50 ml de meio BHI, BHE ou BHS e estes foram incubados aerobicamente (a 160 rpm em incubadora Shaker SL222). Amostras de 1,5ml destas culturas foram coletadas nos tempos de 3, 4, 6, 8, 10, 18, 24 e 48h e submetidas a dois ciclos de centrifugação (a 16.000 x g, 10 min, 4°C) seguidas de filtração com filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore). Volumes de 40 µL por poço das amostras foram transferidos para microplacas de 96 poços (CralPlast, Brasil) contendo por poço, 160 µl solução fresca de acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) com 0,1 g de peroxidase de rábano (Sigma) e 10 µl de solução de o-dianisidina (1 mg/ml em metanol). As placas foram então incubadas protegidas da luz com papel alumínio e incubadas sob temperatura ambiente por 10 min. A seguir, as absorbâncias (A<sub>570nm</sub>) das amostras foram determinadas com auxílio de leitor de microplacas (VersaMAX; Molecular Devices, E.U.A.). As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão preparada a partir de BHI acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diluições seriadas de 4,68 a 0,29 mM.

## **4.6 Análise da formação de biofilmes.**

### **4.6.1 Coleta de saliva total.**

As amostras salivares foram coletadas, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (CEP-FOP; proc. 3.365.892) de um voluntário de 30 anos de idade com boa saúde geral e bucal (ausência de lesões de cárie ou de doença periodontal), não fumante, que não tomava medicamentos. A coleta de saliva foi realizada no período da manhã, após período de pelo menos 2 h de jejum e processada como descrito em estudos anteriores (Kalfas *et al.*, 1991; Camargo *et al.*, 2018), com algumas modificações. Para isto, a saliva foi coletada em tubo do tipo falcon de 50 ml sob banho de gelo, após estimulação de salivação pela mastigação de filme de parafina (Parafilm, Bemis). As amostras foram então clarificadas através de centrifugação (40.000 x g; 15 min, 4°C) e a seguir, esterilizadas por filtração a vácuo através de filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore Express<sup>TM</sup> plus). Alíquotas de 1,5 ml desta saliva foram estocadas a -70 °C até o momento do uso.

### **4.6.2 Análise dos estágios iniciais de formação de biofilmes em superfícies tratadas com saliva.**

As fases iniciais de formação de biofilmes pelas cepas estudadas (biofilmes crescidos por 4 h) foram analisadas através de MEV, como descrito anteriormente (Alves *et al.*, 2022). Para isto, lamínulas de vidro esterilizadas (10 x 10 mm) foram tratadas com 1 ml de saliva esterilizada em microplacas de 24 poços (Corning, EUA), durante 18 h a 4 °C. A seguir, a saliva foi removida por pipetagem e acrescentaram-se a cada poço, 1,5 ml de meio BHI, BHE ou BHS suplementado com 1% de sacarose. Os meios foram então inoculados com culturas das cepas em metade da fase exponencial de crescimento e ajustadas para uma mesma absorbância ( $A_{550nm}$  de 0,03) e as placas incubadas a 37°C por 4 h em atmosfera de 10% CO<sub>2</sub> ou aerobiose por agitação (a 250 rpm em agitador

de placas Nova Instrument-Thermo). Após incubação, retirou-se o meio cultura com micropipeta estéril, e as lamínulas foram lavadas com 1,5 mL de solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) durante 15 min. de agitação (Agitador MicroPlacas – MA 562, Marconi Equipamentos, Brasil). Repetiu-se o procedimento de lavagem por mais duas vezes. A seguir, as lamínulas foram tratadas com 800 µL de solução de glutaraldeído a 2,5% (Sigma- Aldrich) por 30 min, sob temperatura ambiente. Realizou-se então o processo de desidratação dos espécimes, através de incubação com soluções de etanol nas concentrações crescentes de 50 a 100% (15 min. de incubação para cada solução). Após a desidratação, as lamínulas secaram sob temperatura ambiente e montadas em *stubs* de 11 x 10 mm, para a metalização com ouro e análise em microscópio eletrônico de varredura Jeol 4 JSM5600 LV (CMI - FOP/UNICAMP). Imagens representativas dos espécimes foram obtidas sob aumento de 5.000 e 10.000X. Lamínulas tratadas com saliva sem inóculo bacteriano, foram utilizadas como controle negativo.

#### **4.7 Análises da formação de biofilmes em placas de 96 poços, sob diferentes condições de cultivo.**

A biomassa de biofilmes formados durante 4h foi analisada através de ensaios com placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Cralplast). Para isto, volumes de 4,5 ml de meio BHI, BHE ou BHS acrescidos ou não com 1% de sacarose foram inoculados com 500 µl de culturas de cada cepa em fase exponencial ( $A_{550nm}$  0,3). Volumes de 200 µl/poço destas culturas diluídas 1:10 foram então transferidas em oito replicatas para as microplacas, as quais foram então incubadas (37°C) em aerobiose sob agitação (agitador de placas Nova instrumente-Thermo-shaker, 240 rpm) ou em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub> (90% ar) durante 4 h. O restante das culturas diluídas foi incubado paralelamente sob as mesmas condições, para quantificação do crescimento planctônico (durante 4 h), sendo a seguir, homogeneizadas em agitador do tipo vórtex para a leitura das absorbâncias

( $A_{550\text{nm}}$ ). Após a incubação, os fluído das culturas foram removidos de cada poço com a ajuda de micropipeta multicanal, e as placas mantidas em estufa a 37°C por 30 min., antes do processamento dos biofilmes. Os biofilmes foram então lavados por 3 vezes com água destilada, para remover as células pouco aderidas e as placas secadas sob temperatura ambiente por 20 min. em capela. A seguir, os biofilmes foram corados com 200 µl de solução de cristal violeta a 1% durante 30 min., novamente lavados por três vezes com água destilada e secos sob temperatura ambiente por 20 min, em capela. O corante dos biofilmes foi então solubilizado durante através da incubação com etanol absoluto (200 µl por poço) por 30 min., sob temperatura ambiente. Volumes de 100 µl das eluições foram então transferidos para novas placa de 96 poços de fundo chato, para determinação das absorbâncias ( $A_{575\text{nm}}$ ) em leitor de ELISA (VersaMAX, molecular devices, E.U.A.). As medidas de absorbância foram expressas como medidas indiretas da biomassa dos biofilmes. Foram realizados três experimentos independentes.

#### **4.8 Análise da atividade autolítica.**

A atividade autolítica das cepas estudadas foi determinada como descrito anteriormente (Moraes *et al.*, 2014; Camargo *et al.*, 2018), com algumas alterações. Para isso, volumes de 20 ml de culturas em BHI, BHE ou BHS (em  $A_{550\text{nm}} = 0,3$ ) obtidas sob atmosfera aeróbia contendo 10% CO<sub>2</sub>, foram centrifugados (16.000 X g; 5 min, 4°C; centrífuga Eppendorf 5810R) e os *pellets* bacterianos lavados por duas vezes em solução salina tamponada com fosfato. A seguir, as bactérias foram ressuspensas em tampão de autólise (pH 6,5; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> e 0.4% de azida sódica) (Sigma - Aldrich, EUA) e ajustados para uma mesma  $A_{550\text{nm}}$  de 0,9. Volumes de 4 ml de cada suspensão foram imediatamente transferidos para tubos de ensaio de vidro, os quais foram incubados a 44°C (com as tampas semi-abertas) por 72 h em aerobiose. As

absorbâncias ( $A_{550\text{nm}}$ ) foram medidas após 24, 48 e 72h, em amostras de 500  $\mu\text{l}$  coletadas após agitação. Foram realizados três ensaios independentes em duplicata.

#### **4.9 Análise da hidrofobicidade celular.**

As análises de hidrofobicidade foram realizadas de acordo com estudo anterior (Rosenberg *et al.*, 1981), com modificações. Para isso, as cepas foram cultivadas em 25 ml de BHI, BHE ou BHS até atingir uma  $A_{550\text{nm}}$  de 0,3 e as células coletadas por centrifugação (5.000 rpm x 5 min. 4°C; centrífuga Eppendorf 5810R) e lavadas por duas vezes em 25 ml de solução salina (NaCl 0.9%). As células foram então re-suspendidas em tampão de fosfato-uréia-magnésio [contendo por litro, 2g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 7,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,8g de uréia (Sigma-Aldrich, EUA), 0,2g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Synth, Brasil); pH 7,1], para uma absorbância ( $A_{550\text{nm}}$ ) de aproximadamente 0,9. A seguir, 4 ml da suspensão foram transferidos para tubos de vidro estéreis, imediatamente adicionamos de 533  $\mu\text{l}$  de hexadecano (Sigma-Aldrich, EUA) e agitados por 30 seg. A restante da suspensão foi transferido para outro tubo de vidro para uso como controle. Todos os tubos foram incubados a 30°C por 15 min, agitados duas vezes por 30 seg. e incubados por mais 15 min., para separação das fases aquosa e hidrofóbica. A fase aquosa inferior foi então coletada com auxílio de pipeta, para determinação da  $A_{550\text{nm}}$  e subtraída dos valores de absorbância do controle sem hexadecano, para determinação da porcentagem de células hidrofóbicas. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

#### **4.10 Análise da sobrevivência *ex vivo* em sangue humano.**

A análises de sobrevivência *ex vivo* em sangue humano foram realizadas conforme estudos anteriores (Alves *et al.*, 2016), com pequenas modificações, sob aprovação do CEP/FOP (CAAE: 83140418.0.0000.5418). Para isto, volumes de 1 ml de culturas (em BHI, BHE ou BHS;  $A_{550\text{nm}} = 0,3$ ) foram centrifugados (11.000 x g; 2min, 4°C; centrífuga Eppendorf 5810R) e as células lavadas por

duas vezes em PBS estéril e ressuspendidas em 1 ml de sangue humano fresco. Uma alíquota foi coletada logo após a suspensão em sangue (tempo 0 h), para determinação do número de ufc inicial. As amostras foram então incubadas (aerobicamente com agitação orbital suave; 37°C) e alíquotas coletadas após 1, 2, 4, 24, 42 e 60 h de incubação. A determinação das contagens de ufc foi realizada através do cultivo em ágar BHI, BHE e BHS a partir de alíquotas diluídas em série. Como controle de padronização dos inóculos, uma re-suspensão inicial em PBS estéril foi também realizada para monitoramento do número de ufc/ml. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata com amostras de sangue de um voluntário.

## 5 Resultados

### 5.1 A inativação de *ssa\_0094* não afeta significativamente a morfologia de *S. sanguinis* em biofilmes ou a agregação dependente de sacarose

Em *Streptococcus mutans*, proteínas de biogênese de parede celular parecem ser ativadas ou não dependendo do tipo de crescimento bacteriano, planctônico ou em biofilmes, sendo que algumas destas proteínas são requeridas para a interação da superfície bacteriana com exopolissacarídeos derivados da sacarose (Stipp *et al.*, 2013). Em estudo anterior do nosso grupo, verificamos que a inativação de *ssa\_0094* não afetou significativamente o crescimento planctônico de *S. sanguinis* sob diferentes condições de exposição ao O<sub>2</sub>, incluindo-se a incubação estática em aerobiose com 10% de CO<sub>2</sub> e sob aeração (Camargo, 2021). Além disso, análises de microscopia de luz em duas fases de crescimento (metade e final da fase log) não revelaram alterações significativas na formação de cadeias da mutante SK0094 em comparação à cepa parental SK36 e mutante complementada (SK0094+) (Camargo, 2021). Neste estudo, investigamos se *ssa\_0094* poderia afetar a morfologia de *S. sanguinis* quando sob crescimento em biofilmes. Para isto, comparamos a morfologia das cepas estudadas após 4 h de formação de biofilmes em lamínulas de vidro tratadas com saliva humana, em análises de MEV. Como mostrado na Figura 1, as cepas SK36, SK0094 e SK0094+ sob estas condições não demonstraram alterações morfológicas detectáveis.

Para confirmar os dados qualitativos de formação de biofilmes analisador por MEV, avaliamos também a quantidade de formação de biofilmes no mesmo tempo de formação (4h) em placas de poliestireno de 96 poços. Conforme mostrado na Figura 2, observamos pequenas reduções na formação de biofilmes de 4h em SK0094 em relação à cepa parental, sob duas atmosferas distintas. Entretanto, estes fenótipos não foram restaurados na cepa complementada SK0094+. Avaliamos também, o padrão de agregação destas cepas quando crescidas em meio BHI suplementado ou não

com sacarose. Como mostrado na Figura 3, a inativação de *ssa\_0094* também não alterou a agregação bacteriana na presença de sacarose. Como nota, a agregação da cepa parental SK36 na presença de sacarose é pequena, diferente do observado para a cepa de *S. mutans* UA159, a qual produz glucanos altamente insolúveis em água (Figura 3). Portanto, a inativação de *ssa\_0094* não promove alterações significativas na morfologia ou no crescimento durante os estágios iniciais de formação de biofilmes na presença de sacarose.

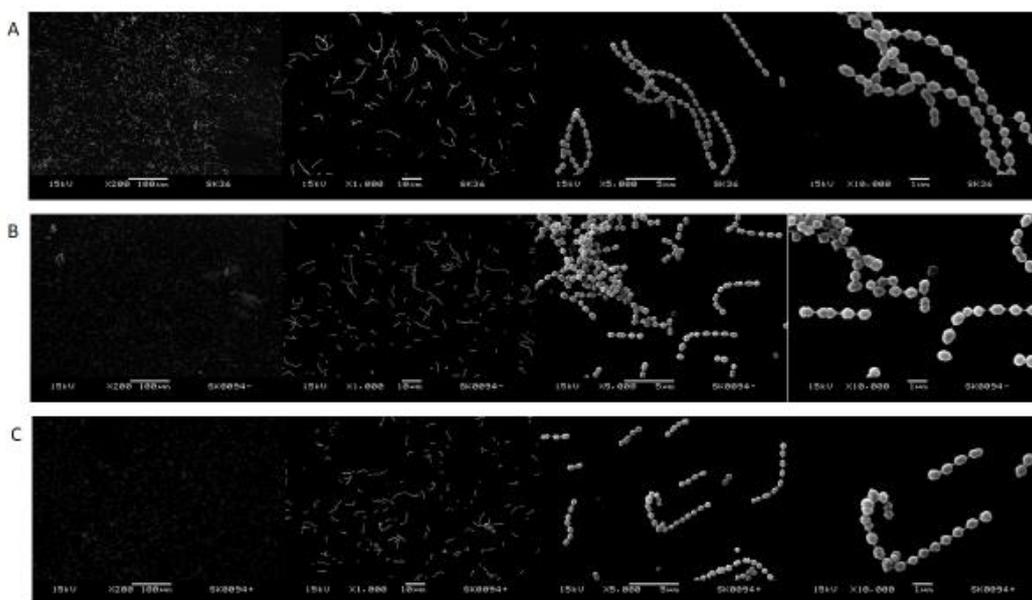


Figura 1. Morfologia das cepas *S. sanguinis* nas fases iniciais de formação de biofilmes. Lamínulas de vidro previamente tratadas com saliva humana estéril foram incubadas com culturas das cepas SK36 (A), SK0094 (B) e SK0094+ (C) em BHI com 1% de sacarose, sob atmosfera de aerobiose (agitação) durante 4 h. A seguir, as lamínulas foram processadas para análises de MEV. Imagens representativas dos biofilmes foram obtidas sob aumento de 200, 1.000, 5.000 e 10.000 vezes.

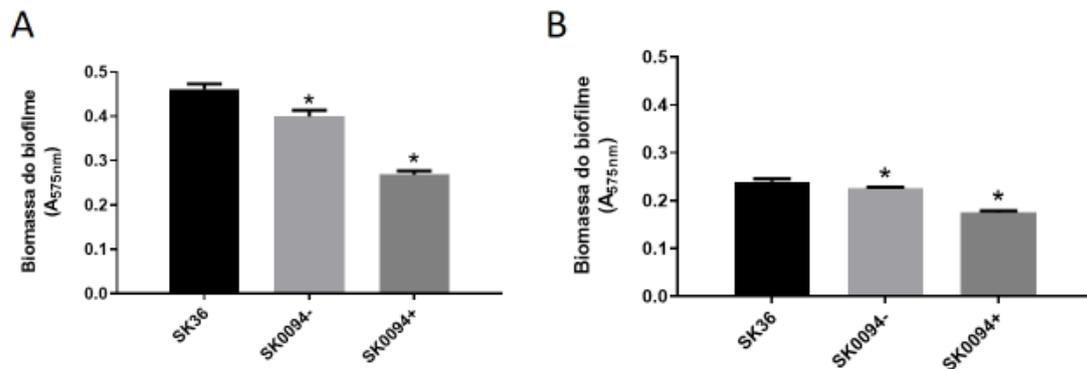


Figura 2. Biomassa de biofilmes em estágios iniciais de formação por cepas *S. sanguinis*. As cepas SK36, SK0094 e SK0094+ foram incubadas em placas de 96 poços contendo meio BHI com 1% de sacarose, em aerobiose sob agitação (A) ou em atmosfera aeróbica contendo 10% de  $CO_2$  (B), durante 4h. A seguir, as placas foram processadas para lavagem e coloração dos biofilmes com violeta cristal a 1%. As absorvâncias ( $A_{757nm}$ ) das eluições do corante em etanol foram então utilizadas como medidas indiretas da biomassa dos biofilmes. As colunas indicam médias de três experimentos independentes realizados em oito replicadas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação à cepas SK36; Kruskal Wallis (\*  $p < 0,05$ ).

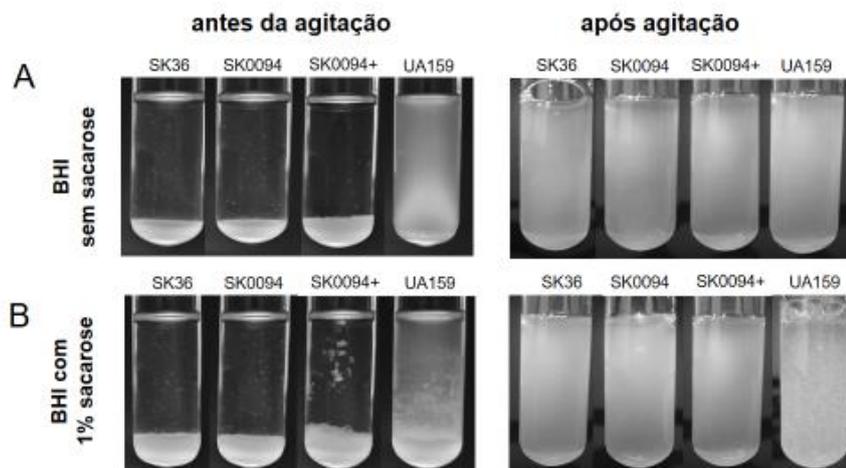


Figura 3. Análise da agregação de cepas de *S. sanguinis*, na presença de sacarose. As cepas SK36, SK0094 e SK0094+ foram crescidas a partir de inóculos padronizados em meio MQD sem sacarose, como controle negativo da agregação bacteriana (A) ou em MQD com 1% de sacarose (B), sob atmosfera de 10% de  $CO_2$ . A seguir, os tubos com as culturas em meio MQD com 1% de sacarose foram fotografados antes e após agitação por 10 seg, em vórtex. A cepa *S. mutans* UA159 foi utilizada como controle positivo da agregação dependente de sacarose.

## 5.2 Alterações na produção de eDNA promovidas pela inativação de *ssa\_0094* não estão relacionadas à maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os mecanismos de produção de eDNA por *S. sanguinis* ainda não são bem compreendidos, mas aparentemente dependem da expressão da enzima piruvato oxidase (SpxB) a qual, sob disponibilidade de O<sub>2</sub>, converte fosfato inorgânico e piruvato em acetil-fosfato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (Kreth *et al.*, 2009). A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece promover a morte de sub-população celular metabolicamente inativa (cerca de 10%) e conseqüentemente, a liberação de DNA cromossômico (Zengh *et al.*, 2011). Mostramos em estudos anteriores do nosso grupo, que SK0094 tem produção aumentada de eDNA quando comparada à SK36 e SK0094+, sendo estas diferenças mais acentuadas no início da fase estacionária de crescimento ( $A_{550nm}$  0,7) (Camargo *et al.*, 2021). Neste estudo, investigamos se a maior produção de eDNA por SK0094 poderia estar relacionada à maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por esta cepa mutante. Para isto, comparamos a cinética de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e eDNA entre as cepas. Como mostrado na Figura 4A, a cepa SK0094 se mostrou defectiva na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sob aerobiose, quando comparada à SK36. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foi totalmente restaurada na mutante complementada, possivelmente por defeitos na expressão da cópia epissomal de *spxB* nas condições oxidativas testadas. Por outro lado, como esperado, a cepa SK0094 produziu mais eDNA do que a cepa parental SK36, e este fenótipo foi restaurado em SK0094. Os dados de produção de eDNA analisados em ensaios de qPCR quantitativo serão confirmados em estudos futuros, uma vez que a eficiência das reações de qPCR com as amostras obtidas no ensaio de cinética demonstraram baixa eficiência (56,8; 57,1 e 62,4%). Apesar disso, bons coeficientes de linearidade das curvas padrão com concentrações crescentes de DNA genômico foram obtidos ( $r^2$ : 0,90; 0,98 e 0,99). Como controle negativo da detecção de eDNA, utilizamos também em um dos experimentos independentes, amostras da cepa mutante isogênica de *spxB*, a qual como esperado, foi defectiva na produção de eDNA (Aragão, 2022) (dados não mostrados). Apesar da baixa eficiência das reações de qPCR, uma

vez que amostras de todas as cepas comparadas eram incluídas nas mesmas reações de amplificação, nossos dados indicam que SK0094 tem maior produção de eDNA de forma não relacionada com a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

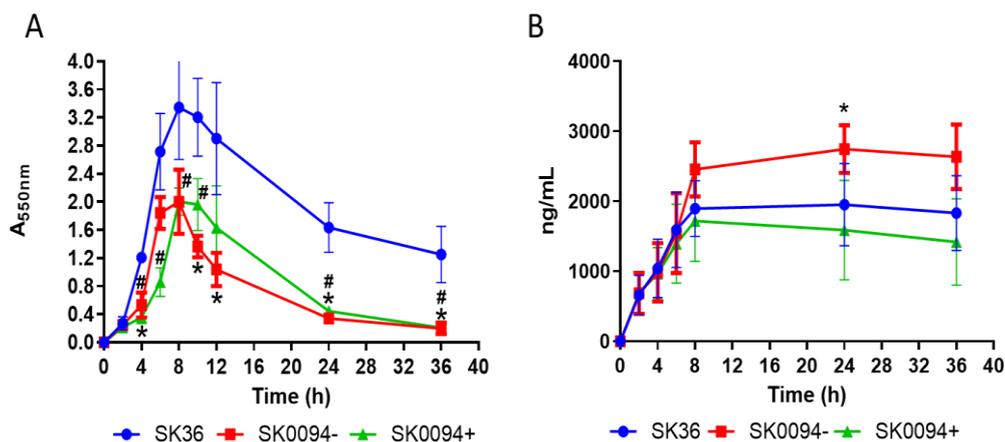


Figura 4. Cinética de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e eDNA por cepas *S. sanguinis*. As cepas SK36, SK0094 e SK0094+ foram cultivadas a partir de inóculos padronizados em meio BHI sob aerobiose (agitação). Alíquotas das culturas foram então coletadas em diferentes tempos para determinação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ensaios colorimétricos (A) e para a análise da produção de eDNA por ensaios de qPCR (B). Os marcadores de cada curva indicam médias de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. A) Asteriscos e cruzetas indicam diferenças significativas entre a cepa parental e as cepas mutante e complementada, respectivamente (Kruskal-Wallis, p < 0,05).

### 5.3 A inativação de *ssa\_0094* tem pequeno efeito na sua atividade autolítica, mas reduz a hidrofobicidade sob concentrações iônicas específicas.

O SDC VicRK regula autolisinas em diferentes espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo-se *S. mutans* (Stipp *et al.*, 2013). Uma vez que a mutante SK0094 demonstrou maior produção de eDNA (Camargo, 2021), de forma independente da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4), investigamos se a mutante SK0094 apresenta alterações no padrão de autólise induzida pelo calor. Como mostrado na Figura 5A, a cepa SK0094 apresentou tênue redução na atividade autolítica quando comparada às cepas SK36 e SK0094+. Confirmando resultados anteriores (Morales *et al.*,

2014), a cepa SK36 demonstrou baixa atividade autolítica quando comparada com a cepa de referência *S. mutans* UA159 (Figura 5A), ressaltando as grandes diferenças das propriedades de parede celular entre estas duas espécies de estreptococos bucais.

Investigamos ainda o efeito da inativação de *ssa\_0094* na hidrofobicidade de superfície de *S. sanguinis*, através da determinação da aderência a hidrocarbonetos (*n*-hexadecano) sob diferentes concentrações iônicas, incluindo-se o tampão original de fosfato-uréia-magnésio com concentração iônica de 348,4 mM (Rosenberg *et al.* 1980) e tampão com concentração 10 vezes menor de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , para uma concentração iônica intermediária entre as saliva (aproximadamente 36mM) e sangue (aproximadamente 140 mM), 85,8 mM (Waldetoft *et al.*, 2016). Não observamos diferenças significativas na hidrofobicidade de superfície entre as cepas no tampão original em estudos paralelos do nosso grupo de pesquisa (dados não mostrados). Entretanto, como mostrado na Figura 5B, sob um concentração iônica de 85,8 mM, a cepa SK0094 demonstrou uma redução significativa da hidrofobicidade de superfície quando comparada à SK36, sendo este fenótipo revertido na cepa complementada (SK0094+). Portanto, a inativação de *ssa\_0094* altera as propriedades de parede celular, resultando em pequena influência na autólise induzida a 44°C e alterando a hidrofobicidade de superfície sob concentrações iônicas específicas.

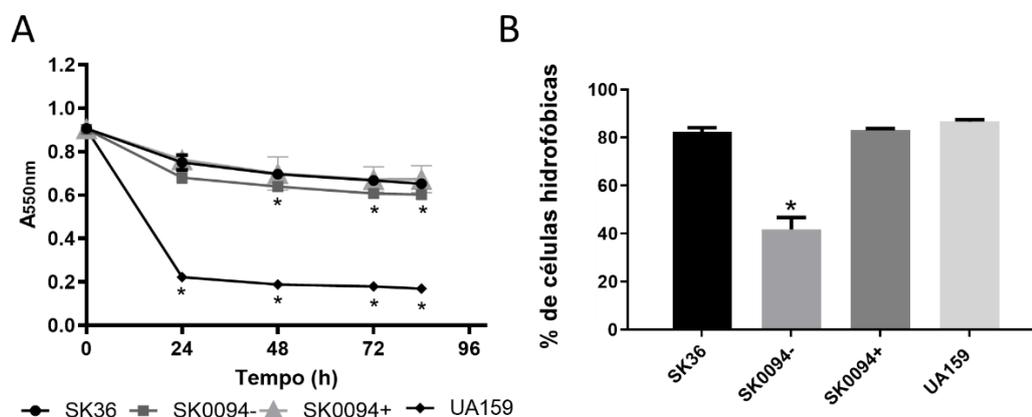


Figura 5. Perfis de autólise e hidrofobicidade de superfície das cepas *S. sanguinis*. (A) As cepas SK36, SK0094 e SK0094+ foram cultivadas em BHI até atingir  $A_{550nm}$  0,3 e ressuspendidas em tampão de autólise ( $A_{550nm}$ ) para incubação a 44°C, para monitoramento da autólise por até 84h. (B) As porcentagens de hidrofobicidade foram determinadas em ensaios de aderência ao hexadecano das cepas crescidas em BHI e re-suspendidas em tampão de fosfato-uréia modificado (concentração iônica de 85,8 mM). Os pontos ou colunas representam médias de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação à cepa SK36 (Análises de variância ANOVA com pós-teste de Dunnet;  $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Não há alterações significativas da parede celular de SK0094 detectáveis por MET.

Uma vez que SK0094 demonstrou fenótipos sugerindo alterações nas propriedades de parede celular, analisamos a estrutura da parede celular das cepas estudadas nas fases log e estacionária de crescimento ( $A_{550nm}$  0,3 e 1,0) crescidas sob diferentes condições aeróbias (aerobiose sob agitação e incubação estática em ar com 10% de  $CO_2$ ). Estas análises não indicaram alterações óbvias na estrutura da parede celular entre as cepas em nenhuma das fases de crescimento. A Figura 6 entretanto, mostra imagens representativas das cepas SK0094 e SK36 em fase estacionária, as quais sugerem que a cepa SK0094 apresenta regiões de descontinuidade de parede celular com maior frequência, quando comparada à SK36. Ambas as cepas mostraram-se circundadas por material extracelular, o qual também foi comumente detectado em regiões subjacentes à membrana citoplasmática nos polos

celulares. Portanto, análises de MET não revelaram alterações morfológicas claras na estrutura da parede celular de SK0094.

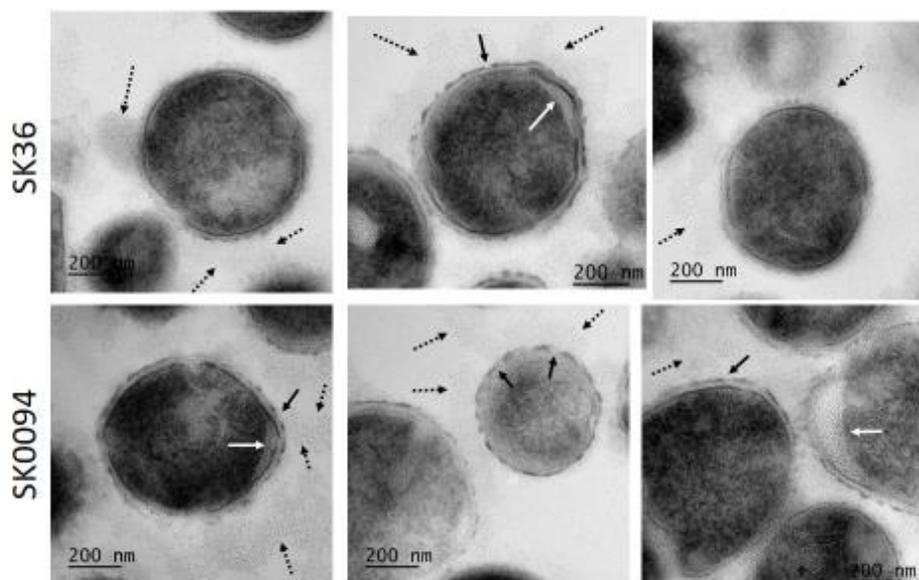


Figura 6. Análise de MET da estrutura da parede celular de cepas *S. sanguinis*. As cepas SK36 e SK0094 foram crescidas em BHI até a fase estacionária de crescimento em atmosfera aeróbia com 10% de CO<sub>2</sub> e processadas para MET. Ambas as cepas demonstraram aparente liberação de material para o meio extracelular (setas pontilhadas) a partir de regiões de descontinuidade da parede celular (setas pretas contínuas). O mesmo material apresenta-se acumulado em regiões subjacentes à membrana citoplasmática (setas brancas). A identidade das cepas é indicada à esquerda dos respectivos painéis horizontais. Os aumentos utilizados são indicados pelas barras horizontais.

### 5.5 A inativação de *ssa\_0094* reduz a persistência de *S. sanguinis* em sangue humano.

Os diversos componentes de superfície da parede celular que potencialmente influenciam a hidrofobicidade de superfície (incluindo-se proteínas de superfície, peptidoglicano, ácidos teicóicos e lipoproteínas) afetam as interações bacterianas com componentes celulares e solúveis da imunidade inata e adaptativa (Rajagopal & Walker, 2017). Assim, investigamos o efeito da deleção de *ssa\_0094*

na persistência de *S. sanguinis* em sangue humano. Como mostrado na Figura 7, SK0094 é claramente defectiva na persistência em sangue humano quando comparada a SK36 e SK0094+. Reduções no número de células viáveis desta mutante foram observados a partir de 2 a 4h, sendo as diferenças consistentemente observadas a partir de 4 h de crescimento até 60h de incubação. Como nota, as contagens bacterianas obtidas no tempo 0h demonstraram não haver alterações significativas de SK0094 na agregação mediada pelo sangue.

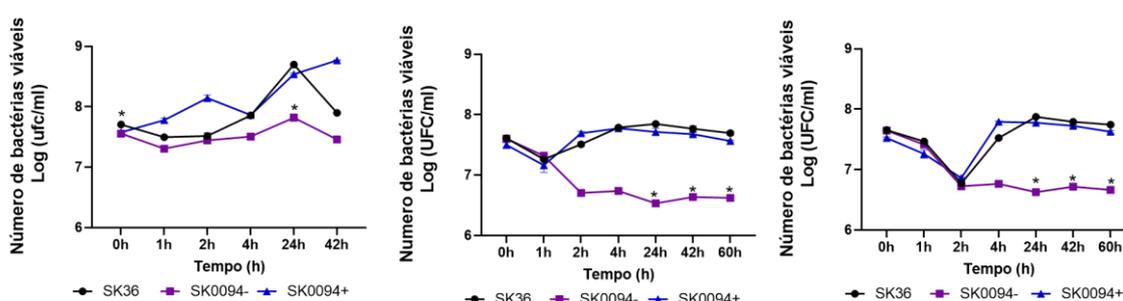


Figura 7. Persistência *ex vivo* de cepas *S. sanguinis* em sangue humano. As cepas SK36, SK0094 e SK0094+ em fase log de crescimento foram ressuspensas em sangue humano e incubadas sob agitação orbital leve, para monitoramento das contagens de bactérias viáveis logo após a suspensão (tempo 0h) e até 60 h de incubação. Os marcadores indicam médias de triplicatas das contagens de ufc/ml; as barras indicam os desvios padrão. Gráficos de três experimentos independentes realizados com diferentes amostras de sangue de um mesmo voluntário são mostrados. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes em relação à cepa parental SK36; Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn com correção para medidas repetidas (\*  $p < 0,05$ ).

## 6. Discussão

Diversas razões explicam o crescente interesse na caracterização de mecanismos de virulência de cepas da espécie *S. sanguinis*. Além de sua clara abundância na cavidade bucal desde a infância, esta espécie apresenta uma série de peculiaridades. Uma delas consiste na maior hidrofobicidade de superfície, quando comparada a outras espécies de estreptococos, como por exemplo, *S. mutans*. Esta característica foi reportada há muito tempo (Gibbons *et al.*, 1983; Schou *et al.*, 1999) e provavelmente, contribui para a maior competitividade desta espécie para iniciar a colonização dos dentes através de interações estáveis com a película adquirida (Gibbons *et al.*, 1983), assim como a componentes da matriz extracelular dos tecidos humanos (Schou *et al.*, 1999). Outra particularidade de *S. sanguinis* é o vasto número de proteínas de superfície, incluindo-se lipoproteínas (60 detectadas no genoma de SK36) e ancoradas à parede celular (33 detectadas em SK36), quando comparada a outras espécies de estreptococos da cavidade bucal e orofaringe (Xu *et al.*, 2007). Estas proteínas não somente podem contribuir para a hidrofobicidade de superfície, mas possivelmente apresentam funções múltiplas e/ou redundantes para a colonização de nichos orais e extra-orais, o que dificulta a investigação das contribuições individuais de proteínas de superfície para os fenótipos de hidrofobicidade e de virulência de *S. sanguinis* (Schou *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2023). Por outro lado, a capacidade de interagir com diversos componentes da película adquirida e da matriz extracelular muito provavelmente torna esta espécie particularmente hábil a se disseminar para sítios extra-orais, o que explicaria seu comum envolvimento em infecções cardiovasculares (Nobbs & Kreth, 2019). Além disso, estas propriedades poderiam explicar a baixa susceptibilidade à ativação do sistema complemento, quando comparada a outras espécies de estreptococos bucais (Alves *et al.*, 2019) e consequentemente, a fraca ativação de linfócitos T (Salam *et al.*, 2006).

Nosso interesse inicial em estudar as funções de *ssa\_0094* decorreu de estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa sobre o papel do sistema de dois componentes (SDC) VicRK na capacidade de colonização bucal e virulência de *S. sanguinis* (Moraes *et al.*, 2014). O sistema VicRK é muito conservado em bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo genômico de bases CG, nas quais regula a biogênese da parede celular durante os processos de divisão, formação de biofilme e competência, assim como a expressão de diversas proteínas de superfície relacionadas à interação com a matriz extracelular de biofilmes e ao escape de fatores imunológicos (Vic de *virulence control*) (Mattos-Graner & Duncan, 2017). Os estímulos que ativam o sistema VicRK aparentemente incluem fatores que afetam a integridade da parede celular, como antibióticos beta-lactâmicos e componentes imunológicos (Mattos-Graner & Duncan, 2017).

Em *S. mutans*, VicRK regula diretamente genes de proteínas contendo domínios característicos de hidrolases de mureína (por exemplo *smaA*, *SMU.2146c* e *gpbB*), assim como de proteínas requeridas para a formação de biofilmes, incluindo-se as proteínas para síntese e interação com a matriz extracelular (GtfB/C, GbpB e WapE) (Senadheera *et al.*, 2005; Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2013). Em *S. sanguinis*, verificamos que VicRK induz diretamente a transcrição de *spxB* (gene não presente em *S. mutans*), *gpbB* (ortólogo de *gpbB* de *S. mutans*; também designado *pcsB* em *S. agalactiae*), e *ssa\_0094* (Moraes *et al.*, 2014). A inativação de *vicK* em *S. sanguinis* promove a formação de cadeias extremamente longas de estreptococos, como também observado em *S. mutans*, além de afetar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a produção de eDNA (Moraes *et al.*, 2014). Curiosamente, a inativação de *vicK* promove uma forte redução nos níveis de transcritos de *ssa\_0094* nas fases log e estacionária de crescimento (cerca de 10 e 19 vezes, respectivamente), o que sugere que *SSA\_0094* tenha papel importante na homeostase da parede celular e/ou na virulência de *S. sanguinis*.

No presente estudo, mostramos que SSA\_0094 contribui de forma modesta para as etapas iniciais de formação de biofilmes *in vitro*. Não foi possível detectar diferenças significativas nas fases iniciais de formação de biofilmes sobre superfícies de vidro pré-tratadas com saliva humana em meio BHI suplementado com sacarose, através de análises de MEV. Além disso, embora estatisticamente significantes, as reduções na biomassa de biofilmes de 4h formados por SK0094 sobre superfícies de poliestireno foram modestas em comparação a SK36, além de não serem restauradas na mutante complementada. Estudos do nosso grupo demonstram que a produção de eDNA é requerida para a formação de biofilmes nas condições testadas (Moraes *et al.*, 2014). Os ensaios para determinação da cinética de produção de eDNA realizados no presente estudo foram compatíveis com aumento na produção de eDNA por SK0094 reportado em culturas com absorbâncias ajustadas (Camargo *et al.*, 2021). Estes aumentos, aparentemente não foram suficientes para alterar os fenótipos de biofilmes em fase inicial de formação. A natureza transitória dos diversos fatores que promovem as fases iniciais de formação de biofilmes, como as interações iônicas/hidrofóbicas iniciais com o substrato, exposição ao oxigênio e subsequente produção de eDNA e de outros componentes da matriz (glucanos derivados da sacarose e/ou amilóide), possivelmente dificultou uma associação direta entre os fenótipos de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou eDNA com os fenótipos de formação inicial de biofilmes. Estudos anteriores de caracterização de formação de biofilmes mais maduros (de 18h) revelaram por outro lado, que SK0094 apresenta defeito na maturação de biofilmes, quando comparada à SK36 em meio BHI, embora a suplementação de BHI com 10% de saliva humana tenha abolido estas diferenças (Camargo *et al.*, 2021).

Nossos estudos com diferentes cepas *S. sanguinis* ressaltam a influência de componentes salivares nos fenótipos de formação de biofilmes de forma cepa-específica, assim como a diversidade de agregação mediada por glucanos derivados da sacarose (Alves *et al.*, 2022). No

presente estudo, não verificamos alterações na interação de SK0094 com polissacarídeos sintetizados na presença de sacarose, em comparações com a cepa parental. Estes resultados não são surpreendentes, uma vez que SK36 é naturalmente defectiva na agregação mediada por glucanos, em parte porque os glucanos sintetizados por esta cepa apresentam maior solubilidade em água e menor estabilidade do que glucanos sintetizados por *S. mutans* (Alves *et al.*, 2022).

No presente estudo, verificamos que a deleção de *ssa\_0094* em SK36 comprometeu a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que pode estar associada à maior sensibilidade da cepa mutante SK0094 ao estresse oxidativo, um ponto que precisaremos investigar em estudos futuros. Estudos preliminares realizados neste projeto indicam que SK0094 não apresenta variações significativas na expressão de *spxB*, *gtfB* ou dos próprios genes *vicRK* (dados não mostrados). Embora a produção de eDNA seja fortemente dependente da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. sanguinis*, há evidências de que a liberação de DNA genômico para o meio extracelular envolva outros mecanismos independentes da presença de O<sub>2</sub> e/ou produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zheng *et al.*, 2011; Cullin *et al.*, 2017). Durante as fases iniciais de formação de biofilmes, quando há maior disponibilidade de O<sub>2</sub>, a produção de eDNA por *S. sanguinis* é claramente dependente da expressão de *spxB* para a síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fator que promove morte celular de cerca de 10% da população e liberação de eDNA (Zheng *et al.*, 2011). Por outro lado, fatores indutores de competência podem também estimular a secreção de uma hidrolase de mureína em *S. sanguinis*, LytF, capaz de promover a lise celular bacteriana e a liberação de eDNA (Cullin *et al.*, 2017).

A proteína SSA\_0094 apresenta um peptídeo sinal compatível com sua secreção, mas a despeito de seu domínio LysM (típico de proteínas que se ligam ao peptideoglicano), não apresenta domínios catalíticos presentes em autolisinas, como o domínio CHAP (CHAP de *cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidase domain*) (Mitchell *et al.*, 2021). Compatível com estes dados, a inativação de *ssa\_0094* promoveu modesta redução na autólise de

*S. sanguinis* mediada pelo calor, o que também está de acordo com os dados de que a inativação de *vicK* não afeta a autólise em SK36 (Moraes *et al.*, 2014). Também não verificamos alterações morfológicas óbvias na ultra-estrutura da parede celular em SK0094 nas análises de MET, embora estas análises tenham revelado contornos elétron-densos mais evidentes na fase estacionária de crescimento de SK0094, quando comparado com SK36 e SK0094+. A menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por SK0094 indica que a maior produção de eDNA por esta cepa reportada em estudos anteriores (Camargo, 2021), pode ser decorrente de alterações na homeostase da parede celular independentes da presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este ponto precisará ser explorado com mais detalhes em estudos futuros. Interessante observar que LytF de *S. sanguinis* é conservada entre diversas espécies de estreptococos bucais, e quando secretada, demonstra uma atividade hidrolítica promíscua (espécie-inespecífica) sob diferentes espécies de estreptococos, podendo, portanto, promover a liberação de eDNA de diferentes espécies, o que contribuiria para trocas genéticas horizontais (Cullin *et al.*, 2017). Entretanto, diferente de LytF, nossas análises *in silico* de genomas de espécies de estreptococos revelaram que a proteína SSA\_0094 é exclusiva de *S. sanguinis* e *S. gordonii*, não sendo detectada em *Streptococcus cristatus*, a terceira espécie mais recentemente incluída no grupo Sanguinis (Baty *et al.*, 2022). A espécie *S. mutans* também não contém ortólogos de SSA\_0094. Por outro lado, identificamos proteínas com menor grau de homologia a SSA\_0094 em estreptococos da cavidade bucal e orofaringe, incluindo-se as espécies comensais *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius* (com identidades de 44,2 a 46,6% para 100 a 99% de sequências alinhadas) e em espécies patogênicas como *Streptococcus pneumoniae* (99% de alinhamento; 49,9% de identidade), *Streptococcus pyogenes* (99% de alinhamento; 45,5% de identidade). Assim, a proteína SSA\_0094 está restrita às espécies *S. sanguinis* e *S. gordonii*.

A inativação de *ssa\_0094* em SK36 promoveu redução significativa da hidrofobicidade de superfície sob concentrações iônicas compatíveis com o sangue e a saliva. Estima-se que a saliva apresente uma concentração de íons de cerca de 36 mM, a qual é cerca de quatro vezes inferior à concentração de íons do plasma (de cerca de 140 mM), outro fluido presente no sulco gengival (Waldetoft, *et al.*, 2016). A influência das concentrações iônicas no fenótipo de hidrofobicidade de SK0094 reforça nossa hipótese de que SSA\_0094 module as interações de *S. sanguinis* com componentes teciduais e/ou solúveis do hospedeiro. Uma vez que *S. sanguinis* coloniza sítios bucais com diferentes proporções de saliva e plasma (por exemplo, fluidos mistos das margens gengivais e/ou epitélio com integridade comprometida), além de persistir na corrente sanguínea, torna-se necessário investigar as intensidades de aderência de *S. sanguinis* ao *n*-hexadecano sob diferentes concentrações iônicas (Rosenberg *et al.*, 2006). Estudos em *Streptococcus pyogenes* revelam diferenças significativas nos perfis de proteínas salivares e/ou plasmáticas ligadas à superfície bacteriana (incluindo-se proteínas salivares antimicrobianas, proteínas do sistema complemento e glicoproteínas solúveis de matriz extracelular), quando estas bactérias são tratados com estes fluidos individualmente ou em que misturas com proporções distintas de saliva e plasma (Happonen *et al.*, 2019). As relações entre os perfis de hidrofobicidade das cepas estudadas de *S. sanguinis* com a ligação componentes séricos do sistema complemento ou de matriz extracelular poderão auxiliar na investigação da contribuição de SSA\_0094 para a colonização dos sítios bucais e cardiovasculares por *S. sanguinis*. Verificamos no presente estudo que SK0094 é defectiva na sobrevivência em sangue humano. Os mecanismos envolvidos neste fenótipo precisam ser explorados. Estudos preliminares do nosso grupo revelaram que SK0094 tem susceptibilidade aumentada à deposição de C3b do sistema complemento, quando comparada à SK36, o que contribuiria para a baixa persistência em sangue humano.

Em resumo neste estudo, mostramos que a proteína SSA\_0094 de *S. sanguinis* tem pequena influência na formação de biofilmes iniciais na presença de sacarose e/ou fatores salivares, embora altere de forma moderada a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e eDNA. Mostramos também que esta proteína não interfere significativamente no processo de autólise induzida pelo calor, embora afete a hidrofobicidade de superfície de *S. sanguinis* sob concentrações iônicas específicas. As alterações de superfície promovidas pela deleção de *ssa\_0094* em SK36 podem estar relacionadas com a contribuição significativa desta proteína para a capacidade de *S. sanguinis* sobreviver em sangue humano reportada neste estudo. Estes dados ampliam o interesse no estudo das funções de SSA\_0094 na biologia de *S. sanguinis*, considerando-se a exclusividade de expressão desta proteína em cepas da espécie *S. sanguinis* e *S. gordonii*. Desta forma, SSA\_0094 pode ser um alvo terapêutico importante para o controle de infecções cardiovasculares por *S. sanguinis*.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- 7.1. O gene *ssa\_0094* tem pequena influência na formação de biofilmes por *S. sanguinis* nas condições experimentais testadas.
- 7.2. A deleção de *ssa\_0094* promove modesto aumento na produção de eDNA de forma independente da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,
- 7.3. A deleção de *ssa\_0094* não promove alterações significativas na estrutura da parede celular de *S. sanguinis*.
- 7.4. O gene *ssa\_0094* influencia na hidrofobicidade de superfície de *S. sanguinis* sob concentrações iônicas específicas, mas tem pequena influência na atividade autolítica induzida pelo calor.
- 7.5. O gene *ssa\_0094* é requerido para a persistência de *S. sanguinis* em sangue humano.

## REFERÊNCIAS

1. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 29;99(22):14434-9. doi: 10.1073/pnas.172501299. Epub 2002 Oct 23. PMID: 12397186; PMCID: PMC137901.
2. Alves LA, Nomura R, Mariano FS, Harth-Chu EN, Stipp RN, Nakano K, Mattos-Graner RO. CovR Regulates *Streptococcus mutans* Susceptibility To Complement Immunity and Survival in Blood. *Infect Immun*. 2016 Oct 17;84(11):3206-3219. doi: 10.1128/IAI.00406-16. PMID: 27572331; PMCID: PMC5067753.
3. Alves LA, de Carli TR, Harth-Chu EN, Mariano FS, Höfling JF, Stipp RN, Mattos-Graner RO. Oral streptococci show diversity in resistance to complement immunity. *J Med Microbiol*. 2019 Apr;68(4):600-608. doi: 10.1099/jmm.0.000955. Epub 2019 Mar 7. PMID: 308437.
4. Alves LA, Ganguly T, Harth-Chú ÉN, Kajfasz J, Lemos JA, Abranches J, Mattos-Graner RO. PepO is a target of the two-component systems VicRK and CovR required for systemic virulence of *Streptococcus mutans*. *Virulence*. 2020 Dec;11(1):521-536. doi: 10.1080/21505594.2020.1767377. PMID: 32427040; PMCID: PMC7239026.
5. Alves LA, Salvatierra GC, Freitas VA, Höfling JF, Bastos DC, Araujo TLS, Mattos-Graner RO. Diversity in Phenotypes Associated With Host Persistence and Systemic Virulence in *Streptococcus sanguinis* Strains. *Front Microbiol*. 2022 Apr 18;13:875581. doi: 10.3389/fmicb.2022.875581. PMID: 35509310; PMCID: PMC9058168.
6. Alves LA, Naveed H, Franco EM, Garcia MT, Freitas VA, Junqueira JC, Bastos DC, Araujo TLS, Chen T, Mattos-Graner RO. PepO and CppA modulate *Streptococcus sanguinis* susceptibility to complement immunity and virulence. *Virulence*. 2023 Dec;14(1):2239519. doi: 10.1080/21505594.2023.2239519. PMID: 37563831; PMCID: PMC10424592.
7. FREITAS, Victor Aragão Abreu de. Análise do papel de exopolissacarídeos e DNA extracelular no escape de *Streptococcus sanguinis* ao sistema complemento. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
8. 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. PMID: 30396893; PMCID: PMC6300630.

9. Baty JJ, Stoner SN, Scoffield JA. Oral Commensal Streptococci: Gatekeepers of the Oral Cavity. *J Bacteriol.* 2022 Nov 15;204(11):e0025722. doi: 10.1128/jb.00257-22. Epub 2022 Oct 26. PMID: 36286512; PMCID: PMC9664950.
10. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86. doi: 10.1159/000324598. Epub 2011 Feb 23. PMID: 21346355; PMCID: PMC3068567.
11. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol.* 2008 May;68(4):838-47. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x. PMID: 18430080.
12. Carlsson J, Grahnén H, Jonsson G, Wikner S. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol.* 1970 Dec;15(12):1143-8. doi: 10.1016/0003-9969(70)90005-1. PMID: 5280120.
13. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet.* 2016 Feb 27;387(10021):882-93. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00067-7. Epub 2015 Sep 1. PMID: 26341945.
14. 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. PMID: 10858217; PMCID: PMC101685.
15. 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. PMID: 29339459; PMCID: PMC5865015.
16. Isabela Camargo; Renata de O. Mattos-Graner. "Análise da função do gene *ssa\_0094* na formação de biofilme por *Streptococcus sanguinis*". Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Odontologia. FOP – UNICAMP, 2021.
17. Cullin N, Redanz S, Lampi KJ, Merritt J, Kreth J. Murein Hydrolase LytF of *Streptococcus sanguinis* and the Ecological Consequences of Competence Development. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Dec 1;83(24):e01709-17. doi: 10.1128/AEM.01709-17. PMID: 28986373; PMCID: PMC5717204.
18. Di Filippo S, Delahaye F, Semiond B, Celard M, Henaine R, Ninet J, Sassolas F, Bozio A. Current patterns of infective endocarditis in congenital heart disease. *Heart.* 2006

- Oct;92(10):1490-5. doi: 10.1136/hrt.2005.085332. Epub 2006 Jul 3. PMID: 16818488; PMCID: PMC1861050.
19. Doyle RJ. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect.* 2000 Apr;2(4):391-400. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00328-2. PMID: 10817641.
  20. 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. PMID: 8366515.
  21. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2011 Feb;79(2):786-96. doi: 10.1128/IAI.00725-10. Epub 2010 Nov 15. PMID: 21078847; PMCID: PMC3028841.
  22. 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. PMID: 12364372; PMCID: PMC126867.
  23. Franco EM, Alves LA, Naveed H, Freitas VAA, Bastos DC, Mattos-Graner RO. Amyloid Fibrils Produced by *Streptococcus sanguinis* Contribute to Biofilm Formation and Immune Evasion. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 28;24(21):15686. doi: 10.3390/ijms242115686. PMID: 37958670; PMCID: PMC10647432.
  24. 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. Epub 2008 Apr 7. PMID: 18390999; PMCID: PMC2423065.
  25. Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun.* 1983 Sep;41(3):1190-6. doi: 10.1128/iai.41.3.1190-1196.1983. PMID: 6885158; PMCID: PMC264625.
  26. Gurung I, Spielman I, Davies MR, Lala R, Gaustad P, Biais N, Pelicic V. Functional analysis of an unusual type IV pilus in the Gram-positive *Streptococcus sanguinis*. *Mol Microbiol.* 2016 Jan;99(2):380-92. doi: 10.1111/mmi.13237. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26435398; PMCID: PMC4832360.

27. Harth-Chu EN, Alves LA, Theobaldo JD, Salomão MF, Höfling JF, King WF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. PcsB Expression Diversity Influences on *Streptococcus mitis* Phenotypes Associated With Host Persistence and Virulence. *Front Microbiol.* 2019 Nov 12;10:2567. doi: 10.3389/fmicb.2019.02567. PMID: 31798545; PMCID: PMC6861525.
28. Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 2–13.
29. Happonen L, Hauri S, Svensson Birkedal G, Karlsson C, de Neergaard T, Khakzad H, Nordenfelt P, Wikström M, Wisniewska M, Björck L, Malmström L, Malmström J. A quantitative *Streptococcus pyogenes*-human protein-protein interaction map reveals localization of opsonizing antibodies. *Nat Commun.* 2019 Jun 21;10(1):2727. doi: 10.1038/s41467-019-10583-5. PMID: 31227708; PMCID: PMC6588558.
30. Herrero ER, Slomka V, Bernaerts K, Boon N, Hernandez-Sanabria E, Passoni BB, Quirynen M, Teughels W. Antimicrobial effects of commensal oral species are regulated by environmental factors. *J Dent.* 2016 Apr;47:23-33. doi: 10.1016/j.jdent.2016.02.007. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26875613.
31. Hirschhausen N, Schlesier T, Peters G, Heilmann C. Characterization of the modular design of the autolysin/adhesin Aaa from *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2012;7(6):e40353. doi: 10.1371/journal.pone.0040353. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22768285; PMCID: PMC3386970.
32. Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>.
33. <https://www.homd.org/>
34. Kalfas S, Rundegren J. Biological qualities of saliva sterilized by filtration or ethylene oxide treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 1991 Jun;6(3):182-6. doi: 10.1111/j.1399-302x.1991.tb00474.x. PMID: 1945502.
35. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005 Nov;187(21):7193-203. doi: 10.1128/JB.187.21.7193-7203.2005. PMID: 16237003; PMCID: PMC1272965.

36. 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. Epub 2009 Aug 14. PMID: 19684131; PMCID: PMC2753043.
37. 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):181-196. doi: 10.1111/omi.12170. Epub 2016 Sep 20. PMID: 27476770; PMCID: PMC5288394.
38. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016 Nov 18;221(10):657-666. doi: 10.1038/sj.bdj.2016.865. PMID: 27857087.
39. 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. PMID: 11125200.
40. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, Siqueira WL. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PLoS ONE* 2013; 8: e67919.
41. Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D493-D496. doi: 10.1093/nar/gkx922. PMID: 29040681; PMCID: PMC5753352.
42. Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D458-D460. doi: 10.1093/nar/gkaa937. PMID: 33104802; PMCID: PMC7778883.
43. M. Rosenberg, D. Gutnick, E. Rosenberg, Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 9, Issue 1, September 1980, Pages 29–33, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>
44. Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 Sep;262(2):129-34. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x. PMID: 16923066.

45. Mattos-Graner RO, Duncan MJ. Two-component signal transduction systems in oral bacteria. *J Oral Microbiol.* 2017 Nov 27;9(1):1400858. doi: 10.1080/20002297.2017.1400858. PMID: 29209465; PMCID: PMC5706477.
46. Martini AM, Moricz BS, Ripperger AK, Tran PM, Sharp ME, Forsythe AN, Kulhankova K, Salgado-Pabón W, Jones BD. Association of Novel *Streptococcus sanguinis* Virulence Factors With Pathogenesis in a Native Valve Infective Endocarditis Model. *Front Microbiol.* 2020 Jan 31;11:10. doi: 10.3389/fmicb.2020.00010. PMID: 32082276; PMCID: PMC7005726.
47. Martini AM, Moricz BS, Woods LJ, Jones BD. Type IV Pili of *Streptococcus sanguinis* Contribute to Pathogenesis in Experimental Infective Endocarditis. *Microbiol Spectr.* 2021 Dec 22;9(3):e0175221. doi: 10.1128/Spectrum.01752-21. Epub 2021 Nov 10. PMID: 34756087; PMCID: PMC8579931.
48. Mitchell SJ, Verma D, Griswold KE, Bailey-Kellogg C. Building blocks and blueprints for bacterial autolysins. *PLoS Comput Biol.* 2021 Apr 1;17(4):e1008889. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008889. PMID: 33793553; PMCID: PMC8051824.
49. 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. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25183732; PMCID: PMC4249271.
50. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. 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. PMID: 16954266; PMCID: PMC1594668.
51. Nobbs A, Kreth J. Genetics of *sanguinis*-Group Streptococci in Health and Disease. *Microbiol Spectr.* 2019 Jan;7(1). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0052-2018. PMID: 30681069.
52. Nobbs A, Kreth J. Genetics of *sanguinis*-Group Streptococci in Health and Disease. *Microbiol Spectr.* 2019 Jan;7(1). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0052-2018. PMID: 30681069.
53. 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.

54. Orstavik D, Kraus FW, Henshaw LC. In vitro attachment of streptococci to the tooth surface. *Infect Immun.* 1974 May;9(5):794-800. doi: 10.1128/iai.9.5.794-800.1974. PMID: 4856824; PMCID: PMC414887.
55. Paik S, Senty L, Das S, Noe JC, Munro CL, Kitten T. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun.* 2005 Sep;73(9):6064-74. doi: 10.1128/IAI.73.9.6064-6074.2005. PMID: 16113327; PMCID: PMC1231064.
56. Raynaud C, Sheppard D, Berry JL, Gurung I, Pelicic V. PilB from *Streptococcus sanguinis* is a bimodular type IV pilin with a direct role in adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jun 1;118(22):e2102092118. doi: 10.1073/pnas.2102092118. PMID: 34031252; PMCID: PMC8179133.
57. Rahman A, Alqaisi S, Nath J. An Unexpected Outcome of *Streptococcus sanguinis* Endocarditis Associated With Orthodontic Bracing in a Young Healthy Patient. *Cureus.* 2023 Jun 2;15(6):e39864. doi: 10.7759/cureus.39864. PMID: 37404441; PMCID: PMC10315059.
58. Rajagopal M, Walker S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;404:1-44. doi: 10.1007/82\_2015\_5021. PMID: 26919863; PMCID: PMC5002265.
59. 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. PMID: 16626374.
60. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC, Treglown JS, Goodman SD, Ellen RP, Cvitkovitch DG. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gpbB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol.* 2005 Jun;187(12):4064-76. doi: 10.1128/JB.187.12.4064-4076.2005. PMID: 15937169; PMCID: PMC1151735.
61. Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van Houte J. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res.* 1977 Mar;12(2):90-106. doi: 10.1111/j.1600-0765.1977.tb00112.x. PMID: 138733.

62. 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. Epub 2013 Mar 12. PMID: 23554881; PMCID: PMC3595261.
63. Schou C, Bøgg-Hansen TC, Fiehn NE. Bacterial binding to extracellular matrix proteins -- in vitro adhesion. *APMIS*. 1999 May;107(5):493-504. doi: 10.1111/j.1699-0463.1999.tb01585.x. PMID: 10335954.
64. Turner LS, Kanamoto T, Unoki T, Munro CL, Wu H, Kitten T. Comprehensive evaluation of *Streptococcus sanguinis* cell wall-anchored proteins in early infective endocarditis. *Infect Immun*. 2009 Nov;77(11):4966-75. doi: 10.1128/IAI.00760-09. Epub 2009 Aug 24. PMID: 19703977; PMCID: PMC2772543.
65. Turner LS, Kanamoto T, Unoki T, Munro CL, Wu H, Kitten T. Comprehensive evaluation of *Streptococcus sanguinis* cell wall-anchored proteins in early infective endocarditis. *Infect Immun*. 2009 Nov;77(11):4966-75. doi: 10.1128/IAI.00760-09. Epub 2009 Aug 24. PMID: 19703977; PMCID: PMC2772543.
66. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol*. 2018 May;200(4):525-540. doi: 10.1007/s00203-018-1505-3. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29572583.
67. Visweswaran GR, Leenhouts K, van Roosmalen M, Kok J, Buist G. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 May;98(10):4331-45. doi: 10.1007/s00253-014-5633-7. Epub 2014 Mar 21. PMID: 24652063; PMCID: PMC4004799.
68. Von Reyn CF, Levy BS, Arbeit RD, Friedland G, Crumpacker CS. Infective endocarditis: an analysis based on strict case definitions. *Ann Intern Med*. 1981 Apr;94(4 pt 1):505-18. doi: 10.7326/0003-4819-94-4-505. PMID: 7011141.
69. Wollein Waldetoft K, Mohanty T, Karlsson C, Mörgelin M, Frick IM, Malmström J, Björck L. Saliva-Induced Clotting Captures Streptococci: Novel Roles for Coagulation and Fibrinolysis in Host Defense and Immune Evasion. *Infect Immun*. 2016 Sep 19;84(10):2813-23. doi: 10.1128/IAI.00307-16. PMID: 27456827; PMCID: PMC5038080.
70. White JC, Niven CF Jr. *Streptococcus S.B.E.*: A *Streptococcus* Associated with Subacute Bacterial Endocarditis. *J Bacteriol*. 1946 Jun;51(6):717-22. doi: 10.1128/jb.51.6.717-722.1946. PMID: 16561124; PMCID: PMC518116.

71. Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki LS, Manque P, Ge X, Serrano MG, Puiu D, Hendricks S, Wang Y, Chaplin MD, Akan D, Paik S, Peterson DL, Macrina FL, Buck GA. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol.* 2007 Apr;189(8):3166-75. doi: 10.1128/JB.01808-06. Epub 2007 Feb 2. PMID: 17277061; PMCID: PMC1855836.
72. Yoshida S, Nakagawa H, Kuwata H, Nabuchi A, Yaso A, Shirota T. Metagenomic analysis of oral plaques and aortic valve tissues reveals oral bacteria associated with aortic stenosis. *Clin Oral Investig.* 2023 Aug;27(8):4335-4344. doi: 10.1007/s00784-023-05053-8. Epub 2023 May 8. PMID: 37157029.
73. Zheng L, Chen Z, Itzek A, Ashby M, Kreth J. Catabolite control protein A controls hydrogen peroxide production and cell death in *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol.* 2011 Jan;193(2):516-26. doi: 10.1128/JB.01131-10.
74. Zheng W, Tan MF, Old LA, Paterson IC, Jakubovics NS, Choo SW. Distinct Biological Potential of *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis* Revealed by Comparative Genome Analysis. *Sci Rep.* 2017 Jun 7;7(1):2949. doi: 10.1038/s41598-017-02399-4. PMID: 28592797; PMCID: PMC5462765.
75. Zhu L, Xu Y, Ferretti JJ, Kreth J. Probing oral microbial functionality--expression of *spxB* in plaque samples. *PLoS One.* 2014 Jan 29;9(1):e86685. doi: 10.1371/journal.pone.0086685. PMID: 24489768; PMCID: PMC3906080.
76. Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol.* 2018 Jun 1;13(8):915-932. doi: 10.2217/fmb-2018-0043. Epub 2018 Jun 8. PMID: 29882414; PMCID: PMC6060398.
77. Zhu B, Macleod LC, Newsome E, Liu J, Xu P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediates protection of *Porphyromonas gingivalis* from *Streptococcus sanguinis* hydrogen peroxide production in multi-species biofilms. *Sci Rep.* 2019 Mar 20;9(1):4944. doi: 10.1038/s41598-019-41467-9. PMID: 30894650; PMCID: PMC6426879.
78. Zhu B, Green SP, Ge X, et al. Genome-wide identification of *Streptococcus sanguinis* fitness genes in human serum and discovery of potential selective drug targets. *Mol Microbiol.* 2021;115(4):658–671. doi: 10.1111/mmi.14629.

79. Zhuang PL, Yu LX, Liao JK, Zhou Y, Lin HC. Relationship between the genetic polymorphisms of vicR and vicK *Streptococcus mutans* genes and early childhood caries in two-year- old children. *BMC Oral Health* 2018;18:39.

## Anexo 1

Análise de similaridade de texto pela plataforma Turnitin.

### Tese de doutorado Geovanny

#### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



#### FONTES PRIMÁRIAS



Excluir citações	Em	Excluir correspondências	< 1%
Excluir bibliografia	Em		



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 13190819.9.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

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

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.365.892

#### Apresentação do Projeto:

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

Delineamento da pesquisa: Trata-se de estudo laboratorial, com culturas microbiológicas, que envolverá 6 participantes, com idades entre 25 e 35 anos, 3 de cada sexo, alunos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, dos quais serão coletadas amostras de saliva total estimulada. Este projeto visa investigar o efeito da inativação de genes *srpA*, *iga*, *spxB*, *ssa\_0094* e *gtfP* potencialmente envolvidos na interação de *S. sanguinis* com a PA e/ou na produção de componentes da matriz extracelular [DNA extracelular (eDNA) e glucanos produzidos a partir da sacarose], na formação de biofilmes. Para isto, análises *in vitro* serão realizadas para comparar biofilmes formados pela cepa *S. sanguinis* parental SK36 com as respectivas mutantes isogênicas de *srpA*, *iga*, *spxB*, *ssa\_0094* e *gtfP*, em meios complexo e quimicamente definido acrescido ou não de sacarose e suplementados com saliva humana. Estágios iniciais de formação de biofilmes serão analisados através de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados durante 4 h sobre lamínulas de vidro previamente tratadas com saliva humana. A biomassa de biofilmes formados durante 18 h em placas de poliestireno corados com violeta cristal, também será comparada entre as cepas. A biomassa e estrutura tridimensional de biofilmes formados durante 4, 18 e 24h, serão analisadas através de microscopia confocal.

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

Critérios de inclusão: Será estabelecido como critério de inclusão que os voluntários com idade entre 25 e 35 anos, que apresentem boa saúde geral e saúde bucal e que não tomem medicamentos regularmente ou que tenham tomado antibióticos por pelo menos dois meses antes da coleta de saliva. A análise da saúde bucal será realizada através de exame clínico intra-bucal por cirurgião dentista (VAA) no consultório de pesquisa clínica da Área de Bioquímica (Departamento de Ciências Fisiológicas) da FOP/UNICAMP, para confirmar a ausência de lesões da cárie ativas ou de doença periodontal. Os voluntários também deverão ser estudantes de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP). As justificativas para seleção deste grupo incluem : 1) facilidade de padronização da faixa etária, uma vez que geralmente os pós-graduandos estão dentro da faixa etária escolhida para este projeto; 2) facilidade para esclarecer os participantes sobre os objetivos e outros aspectos da pesquisa, porque os alunos de pós-graduação apresentam maior facilidade para compreensão de estudos científicos e sobre os benefícios gerados a médio e longo prazo a partir de seus resultados; 3) facilidade para o recrutamento e agendamento das coletas de amostra, pois os pós-graduandos frequentam a FOP-UNICAMP com regularidade e apresentam horários flexíveis. Estes terão ainda fácil acesso ao grupo de pesquisa caso necessitem de alterações em datas de coleta de amostra; 4) os pós-graduandos apresentam maior disposição e comprometimento com o desenvolvimento de projetos de pesquisa.

Critérios de exclusão: Serão excluídos da pesquisa, adultos com problemas de saúde geral ou bucal. Também serão excluídos voluntários que tenham feito uso de medicamentos até 2 meses antes da coleta.

Cepas e condições de cultivo: A cepa SK36 isolada da placa dental foi escolhida como referência da espécie *S. sanguinis*, porque além de ser competente para manipulação genética, tem o genoma conhecido (Xu et al., 2007) e foi caracterizada quanto à formação de biofilmes por nosso grupo (Moraes et al., 2014; Camargo et al., 2018) e por outros grupos com expertise nesta espécie bacteriana (Zhu et al., 2018b). Mutantes isogênicos de *srpA*, *gtfP*, *spxB*, *ssa\_0094*, iga serão obtidos na cepa SK36, através da recombinação homóloga dos loci destes genes com os respectivos alelos mutados, conforme descrito em estudos anteriores (Moraes et al., 2014; Camargo et al., 2018). Serão utilizadas também, 5 cepas de *S. sanguinis* isoladas de pacientes com bacteremia (SK330, SK353, SK1056, SK1059, SK678) e 4 cepas isoladas de biofilmes dentários (SK72, SK115, SK150, SK160), as quais foram gentilmente cedidas pelo Dr. Mogens Kilian do Institute of Medical Microbiology and Immunology, Aarhus University, Aarhus, Dinamarca. Os genomas destas cepas foram sequenciados e estão em fase de anotação no GenBank, (<http://www>.

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

ncbi.nlm.nih.gov/genome/). Estas cepas são, portanto, bem conhecidas e disponibilizadas mundialmente para uso irrestrito pela comunidade científica, sem necessidade de pagamento (exceto pelos custos de envio), uma vez que não consistem em produto de valor comercial. Estas cepas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Mogens Kilian, da instituição de origem, o que não implica em qualquer atividade de colaboração ou obrigação. As cepas foram enviadas por FedEx Corporation (empresa estrangeira de remessa expressa de correspondência, documentos e objetos) com destino a Faculdade de Odontologia de Piracicaba em nome da Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner. As cepas serão mantidas a -70oC e reativadas a partir dos estoques congelados em ágar Brain Heart Infusion (BHA) (Merck Labs, Alemanha). Após o crescimento (48 h; 37oC; 10 % CO<sub>2</sub>), colônias isoladas serão inoculadas em 5 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Merck Labs) ou meio quimicamente definido (MQD) (Camargo et al., 2018) e incubadas sob as mesmas condições durante 16 h. Estas culturas terão as absorbâncias (A<sub>550nm</sub>) mensuradas e inóculos ajustados pelas absorbâncias transferidos para meios fresco acrescido ou não de 1% de sacarose (único substrato para a produção de glucanos) e incubados nas mesmas condições até atingir A<sub>550nm</sub> igual a 0,3, correspondente à fase log de crescimento. Para a manutenção das cepas mutantes, os meios serão suplementados com eritromicina (5 g/ml).

Para utilização das cepas mutantes (Organismos Geneticamente Modificados – OMG) será submetido formulário à Comissão Interna de Biossegurança da FOP (CIBio – FOP), para autorização de atividades em contenção com OMG de acordo com às Resoluções Normativas da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

Construção das cepas mutantes isogênica dos genes *srpA*, *gtfP*, *spxB*, *ssa\_0094* e *iga*: Mutantes isogênicos de *srpA*, *spxB*, *gtfP*, *ssa\_0094* e *iga* serão obtidos a partir da cepa referência SK36, utilizando-se de recominação homóloga com alelo mutado construído através de estratégia de PCR e ligação, como descrito em nossos estudos anteriores (Moraes et al., 2014; Camargo et al., 2018), com algumas modificações. Nos alelos de DNA recombinante, as sequências codificadoras dos genes a serem removidos serão substituídas pelo gene de resistência à eritromicina obtido do plasmídeo pVA838 (*erm r*). Para a confecção dos alelos mutados, o DNA genômico de SK36 será purificado a partir de 15 ml de cultura em BHI. O DNA plasmidial será purificado de culturas de *E. coli* contendo pVA838, através de extração alcalina e tratamento com fenol-clorofórmio. As reações de PCR serão 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 serão monitorados em géis de agarose corados com brometo de etídio. Os produtos de PCR serão purificados utilizando-se StrataPrep PCR Purification

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

Kit (Stratagene, E.U.A.), segundo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, as regiões que flanqueiam os genes a serem removidos do genoma de SK36 (srpA, gtfP, spxB, ssa\_0094, gtfP) serão amplificadas com pares de primers específicos (designados P1-P2 e P3-P4). Os primers P2 e P3 deverão conter na sua extremidade 5', as sequências dos sítios de restrição das endonucleases Ascl e XhoI (New England BioLabs, EUA), respectivamente. Amplicons com o gene erm r serão obtidos a partir de pVA838 em reações de PCR com primers E1 e E2, os quais conterão nas extremidades 5', os sítios de restrição de Ascl e XhoI, respectivamente. Os amplicons obtidos com os pares de primers P1/P2, P3/P4 e E1/E2 serão purificados, digeridos com as endonucleases Ascl e XhoI e a seguir purificados e ligados utilizando-se a enzima DNA ligase T4 (Thermo Fisher Scientific), segundo as recomendações do fabricante. Os produtos das reações de ligação serão então utilizados como DNA molde de reações de PCR com os primers P1 e P4 de cada gene, para gerar múltiplas cópias dos fragmentos recombinantes P1-erm r -P4. A estrutura dos alelos será checada através de reações de PCR com combinações dos primers P1/E2, E1/P4, P1/P2, P3/P4 e E1/E2).

Para obtenção das cepas mutantes, o total de 10 g dos fragmentos recombinantes purificados será utilizado para transformação natural da cepa SK36, como descrito anteriormente (Moraes et al., 2014). Os transformantes recuperados de culturas em BHA acrescido de eritromicina serão então isolados e a correta recombinação homóloga com os alelos mutados confirmada através de reações de PCR com os pares de primers para cada gene (P1/E2, E1/P3, P1/P4, P1/P2, P3/P4 e E1/E2). Para cada gene, um transformante com correta inserção do respectivo alelo mutado terá então seu DNA cromossômico purificado e o locus mutado analisado através de sequenciamento. Os mutantes obtidos serão estocados a -70 °C e a -20 °C em Skim milk (Difco). Para gerar os mutantes complementados, cada mutante isogênico será transformados com plasmídeo pDL278 contendo cópia intacta do respectivo gene removido do cromossomo (Moraes et al., 2014). O plasmídeo pDL278 tem origem de replicação para estreptococos e contém gene de resistência à espectinomicina, antibiótico que será utilizado como marcador. As cepas complementadas serão utilizadas como controles em todas as análises fenotípicas dos respectivos mutantes, para nos certificarmos de que a remoção dos genes estudados não promoveu modificações secundárias no genoma ou na transcrição de outros genes que possam alterar as características fenotípicas analisadas.

Seleção dos voluntários para coleta da saliva: Serão selecionados seis voluntários sadios, adultos, com idade entre 25 e 35 anos, e com boa saúde bucal, incluindo-se ausência de lesões de cárie e de doença periodontal, entre as pessoas atuando na pós-graduação da FOP-UNICAMP, três de

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

cada gênero. A seleção dos voluntários para estudo será realizada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba conforme definido na Resolução nº 466/12, relativo à pesquisa com seres humanos.

Coleta de saliva humana: Amostras de saliva total humana estimulada serão coletadas de cada voluntário, conforme protocolo descrito por (Henson et al., 2010), com algumas modificações. As coletas serão realizadas pelo período da manhã (9 – 9,5 h), devendo o voluntário não ter ingerido alimentos, medicamentos ou realizado procedimentos de higiene bucal por 2 h antes da coleta. Após enxague bucal com água destilada durante 1 min, serão aguardados 5 min. para a estimulação da salivação através da mastigação um pedaço padronizado de Parafilm®, e coleta de um total de 10 ml de saliva em tubo de vidro esterilizado, o qual será mantido em banho de gelo. As amostras de saliva serão processadas imediatamente após a coleta, sendo primeiramente acrescidas de ditiotreitol (DTT) a 2,5 mM (para permitir a filtração) (Camargo et al., 2018), clarificadas por centrifugação (17.000 x g, 15 min., 4°C) e esterilizadas por filtração sob vácuo, em filtros de baixa adsorção de proteínas com poros de 0,22 µm de diâmetro (Nalgene). Alíquotas das amostras serão então mantidas em tubos de vidro a -70°C até o momento do uso. Estas amostras serão identificadas por números arbitrários anotados no caderno de experimento de um dos pesquisadores deste projeto (GNCS).

Análises da formação inicial de biofilmes através de microscopia eletrônica de varredura (MEV): As fases iniciais de formação de biofilmes pelas cepas estudadas serão analisadas através de MEV, como descrito anteriormente (Moraes et al., 2014), com mínimas modificações. Resumidamente, lamínulas de vidro serão tratadas com saliva humana estéril por 18h (4°C) e transferidas horizontalmente para poços de placas de 24 poços contendo diluições 1:10 de culturas de *S. sanguinis* em BHI ou MQD (A550nm 0,3), em meio fresco acrescido de 10% de saliva e suplementado ou não de 1% de sacarose. As placas serão incubadas por 4h a 37°C, sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub>, para a formação de biofilmes. As seguir, as lamínulas serão gentilmente lavadas com PBS (pH 7,4) e processadas para microscopia eletrônica de varredura. Imagens digitais dos biofilmes serão obtidas em microscópio eletrônico de varredura (JSM 5600LV; JEOL, Japão) disponível no Centro de Microscopia e Imagens (CMI) da FOP-UNICAMP. As absorbâncias (A550nm) das culturas bacterianas de cada poço também serão determinadas, para o monitoramento do crescimento planctônico. Serão realizados pelos menos três experimentos independentes

Análises de biofilmes maduros em placas de poliestireno: Para comparar a maturação de biofilmes entre a cepa parental e as mutantes isogênicas, será quantificada a biomassa de biofilmes formados por estas cepas em placas de poliestireno durante 18h, como descrito em estudo

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

anterior (Camargo et al., 2018). Para isto, serão realizadas diluições (1:10) de culturas das cepas em BHI ou MQD (com A550nm 0,3) em meio fresco contendo 10% de saliva estéril, suplementado ou não com 10% de saliva. Volumes de 200 µl destas diluições serão transferidos em sextuplicata para placas de poliestireno de 96 poços (Cral Plast, Cotia, SP). Poços com o mesmo meio de cultura sem o inóculo bacteriano serão utilizadas como controle negativo. As placas serão então incubadas a 37oC, sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub>, durante 18h. A seguir, alíquotas das suspensões serão transferidas para outra placa de 96 poços, para o monitoramento do crescimento planctônico através da leitura das absorbâncias. Os biofilmes serão então lavados com água destilada por três vezes, para remoção das células pobremente aderidas, e a seguir, corados com violeta cristal a 1% durante incubação a temperatura ambiente (30 min.). Após nova série de lavagens, os biofilmes serão secos sob temperatura ambiente, durante 1 a 2 h. O corante dos biofilmes será então solubilizado em volumes de 200 µl de etanol durante incubação por 30 min. a temperatura ambiente. Volumes de 100 µl do corante eluído serão transferidos para novas placas para leitura da A575nm, como medida indireta de biomassa dos biofilmes. Pelo menos três experimentos independentes serão realizados. Análises de biofilmes de 4 a 18 h através de microscopia confocal. Os biofilmes para as análises de microscopia confocal serão realizados como descrito por (Liu et al., 2017), com algumas modificações. Culturas de 16 h das cepas SK36 e respectivos mutantes isogênicos em BHI ou MQD serão diluídas (1:10) em meio fresco suplementado com 10% de saliva estéril e contendo ou não 1% de sacarose. Estas diluições serão transferidas para placas de 24 poços e incubadas a 37oC (sob atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>) durante 4, 18\* e 24h. A seguir, os fluídos de cultura serão transferidos para outras placas, para monitoramento do crescimento planctônico, através da determinação das medidas de A550nm. Os biofilmes serão então gentilmente lavados com PBS (pH 7,4) e corados com 1,5 µM Syto 9 (ThermoFisher Scientific, E.U.A.) durante 25 min. Após remoção do corante, os biofilmes serão gentilmente lavados com PBS e visualizados em microscópio confocal TCS SP5 (Leica), disponível no CMI da FOP-UNICAMP. Células coradas por Syto 9 serão visualizadas através da excitação a 488 nm, utilizando-se filtros para comprimentos de onda de 493 a 559 nm. As imagens obtidas em diferentes secções Z serão capturadas e analisadas utilizando-se o software Image J. Serão analisados biofilmes formados em três experimentos independentes. Análise dos dados: Os biofilmes formados durante 4h sobre lamínulas de vidro, serão analisados a partir de imagens digitais obtidas em aumento de 1.300 vezes, as quais serão obtidas em 32 áreas pré-determinadas (96 x 63 µm) igualmente distribuídas sobre as lamínulas de vidro. Estas

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

imagens serão analisadas com auxílio do programa ImageJ Image Processing and Analysis software in Java (NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>), para determinação do tamanho das áreas das lamínulas recobertas por biofilmes obtidas de dois experimentos representativos (total de 64 imagens). O mesmo programa será utilizado, para comparação das medidas de profundidade ( $\mu\text{m}$ ) e coeficientes de rugosidade obtidos por microscopia confocal. Os valores de área e biomassa obtidos nas análises de MEV e confocal e as medidas de absorvância dos biofilmes obtidas em placas de microtitulação serão comparados entre as cepas, utilizando-se teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, ou através de análises de Mann-Whitney, nas quais cada cepa mutante será comparada individualmente à cepa parental SK36. As diferenças serão consideradas estatisticamente significantes, quando valores de p forem inferiores a 0,05. Resultados esperados: Espera-se com este estudo, elucidar o papel dos genes *srpA*, *spxB*, *gtfP*, *ssa\_0094* e *iga* nos diferentes estágios de formação do biofilme de *S.sanguinis*. É possível que os produtos codificados por esses genes sejam importantes para a dinâmica de formação de biofilme de *S.sanguinis* desde a adesão inicial até a maturação, uma vez que essas enzimas estão relacionadas com a degradação de componente do sistema imune presente na película adquirida e com o aumento da biomassa. Portanto, compreender as funções destes genes no processo de formação de biofilme *S.sanguinis* é importante para o desenvolvimento de estratégias de controle de biofilmes dentários.

Local de realização da pesquisa: A pesquisa será realizada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP na Área de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral. Os ensaios serão realizados no Laboratório de Biologia Molecular e no Laboratório de Cultura de Células, ambos localizados na Área de Microbiologia e Imunologia. Adicionalmente será utilizado o Centro de Microscopia e Imagem da FOPUNICAMP. Os exames clínicos serão realizados na área de Bioquímica da FOP-UNICAMP.

O cronograma proposto para a pesquisa no projeto informa o início em 2019, o término em 2021 e prevê cerca de 36 meses para conclusão do estudo. O cronograma descrito na PB indica que a pesquisa será iniciada em 01/06/2019 e será concluída em 17/12/2021, em cerca de 31 meses.

A LISTA DE PESQUISADORES CITADA na capa do projeto de pesquisa inclui Victor Aragão Abreu de Freitas (Cirurgião-Dentista, Doutorando no PPG em Biologia Bucodental, Área de Microbiologia e Imunologia, da FOP/UNICAMP, Pesquisador responsável), Johnny Naoki Soares (Graduando no curso de Odontologia da FOP/UNICAMP, Pesquisador participante), Isabela Camargo Graduanda no curso de Odontologia da FOP/UNICAMP, Pesquisadora participante), Eduardo Martinelli Franco (Biólogo, Mestrando no PPG em Biologia Bucodental, Área de Microbiologia e Imunologia, da

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

FOP/UNICAMP, Pesquisador participante), Geovanny Nilton Cuya Salvatierra (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Biologia Bucodental, Área de Microbiologia e Imunologia, da FOP/UNICAMP, Pesquisador participante), Livia Araujo Alves (Cirurgiã-dentista, Pós-doutoranda no Departamento de Diagnóstico Oral da FOP/UNICAMP, Pesquisadora participante) e Renata de Oliveira Mattos-Graner (Cirurgiã-dentista, Docente do Departamento de Diagnóstico Oral da FOP/UNICAMP, Pesquisadora participante), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

**Objetivo da Pesquisa:**

**HIPÓTESE:** Estudos prévios do nosso grupo revelaram dois sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC) que modulam a formação de biofilmes por *S. sanguinis*, os SDCs VicRK e SptRS (Moraes et al., 2014; Camargo et al., 2018). Como SDCs típicos, ambos estes sistemas são formados por uma proteína sensora de membrana histidina quinase, a qual ao detectar sinais ambientais específicos, se auto-fosforila no resíduo de histidina específico e transfere o grupo fosfato para a segunda proteína do sistema, o regulador de resposta cognato intra-citoplasmático. Ao ser fosforilado, este regulador de resposta assume uma conformação capaz de se ligar às sequências reguladoras dos genes alvo, os quais tem sua transcrição ativada ou reprimida (Mattos-Graner and Duncan, 2017). A inativação de ambos os SDC VicRK e SptRS na cepa *S. sanguinis* SK36 altera significativamente a formação de biofilmes. A inativação de VicRK reduz a formação de biofilmes associada à inibição da transcrição dos genes *spxB* e *gtfP*, *ssa\_0094*, enquanto que a inativação de SptRS promove o aumento da formação de biofilmes associada ao aumento significativo da transcrição dos genes *spxB* e *iga*. Portanto, análises destes dois SDCs reforçam a hipótese de que os genes *spxB*, *gtfP*, *ssa\_0094* e *iga* participam de forma coordenada na formação de biofilmes por *S. sanguinis*. Análises da participação destes genes na formação e maturação de biofilmes de *S. sanguinis* poderá portanto gerar informações importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares de formação de biofilmes por esta espécie.

**OBJETIVO PRIMÁRIO:** Investigar a influência dos genes de *S. sanguinis* potencialmente envolvidos na produção de eDNA e de exopolissacarídeos (*srpA*, *spxB*, *gtfP*, *ssa\_0094* e *iga*) na capacidade de *S. sanguinis* formar biofilmes.

**OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:** 1) Avaliar o efeito da inativação dos genes *srpA*, *spxB*, *gtfP*, *SSA\_0094* e *iga* na capacidade da cepa *S. sanguinis* SK36 de iniciar biofilmes in vitro sobre superfícies recobertas com saliva humana em meio de cultura complexo (BHI) e meio quimicamente definido (MQD) suplementado ou não com 0,1% de sacarose. 2) Avaliar o efeito da inativação dos genes *srpA*, *spxB*, *gtfP*, *SSA\_0094* e *iga*, na maturação de biofilmes formados in vitro pela cepa SK36 durante 18 h, na presença de saliva humana, sob as mesmas condições nutricionais indicadas no

**Endereço:** Av. Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

objetivo específico 1. 3) Avaliar o efeito da inativação dos genes *srpA*, *spxB*, *gtfP*, *SSA\_0094* e *iga* em SK36 na quantidade de biomassa e na estrutura tridimensional de biofilmes formados *in vitro* na presença de saliva humana sob as condições nutricionais indicadas no objetivo 1.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Quanto aos riscos e desconfortos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que “Não há riscos previsíveis, exceto a possível fadiga muscular para estímulo da mastigação. Isto será minimizado, porque a saliva será coletada durante tempo máximo de 10 min. O pesquisador envolvido na coleta de saliva deverá ser previamente treinado para aplicar os procedimentos de coleta salivar. Os laboratórios da área de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP possuem estrutura de segurança adequada para esta pesquisa”.

Quanto aos benefícios diretos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que “As pessoas que apresentarem interesse em participar da pesquisa passarão por uma triagem para obedecer ao critério de inclusão relacionado à condição de saúde bucal. Para isso, será realizado um exame clínico odontológico geral acompanhando de instruções de higiene oral, o exame pode levar ao diagnóstico de condições patológicas desconhecidas pelo voluntário. O voluntário será informado sobre a sua situação de saúde oral no momento do exame e, quando necessário, será orientado a procurar assistência odontológica especializada”.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Quanto ao modo de abordagem dos participantes da pesquisa para a obtenção do TCLE os pesquisadores informaram que “Estudantes de Pós-Graduação da FOP com idades entre 25 e 35 anos, saudáveis serão abordados e convidados a participar da pesquisa, após ter-lhes sido explicado os objetivos da pesquisa e os detalhes de como será feita a coleta de sangue e sua utilização na pesquisa. As pessoas que se interessarem em participar deverão então ler o TCLE e esclarecer todas as dúvidas, para que sua participação seja registrada. O aceite em participar ou não da pesquisa não envolverá o recebimento de benefícios financeiros ou de serviço, deixando claro que não haverá obrigatoriedade na participação e que os voluntários não devem possuir nenhum tipo de dependência com os pesquisadores envolvidos neste projeto”.

Quanto à justificativa para participação de grupos vulneráveis os pesquisadores informaram que “Estudantes de Pós-graduação são considerados grupo vulnerável. As razões pelas quais pessoas deste grupo serão selecionadas incluem: 1) facilidade para padronização da faixa etária, uma vez que geralmente os pós-graduandos estão dentro da faixa etária ideal para este estudo; 2) maior capacidade de compreensão dos objetivos da pesquisa e dos seus benefícios científicos; 3) facilidade para o recrutamento e agendamento das coletas de amostra, pois os pós-graduandos

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

frequentam a FOP-UNICAMP com regularidade e apresentam horários flexíveis; 4) conveniência aos voluntários para comparecer para a coleta de saliva, uma vez que estas podem ser realizadas nos horários em que os pós-graduandos e encontra na FOP; 5) diminuição de problemas decorrentes do não cumprimento do agendamento para coleta das amostras; pós-graduandos conhecem as rotinas de pesquisa laboratorial e por isto demonstram maior comprometimento com pesquisas científicas”.

Quanto às medidas para proteção ou minimização dos desconfortos e riscos previsíveis os pesquisadores informaram que “Não há riscos previsíveis, exceto a possível fadiga muscular para estímulo da mastigação. Isto será minimizado, porque a saliva será coletada durante tempo máximo de 10 min. O pesquisador envolvido na coleta de saliva deverá ser previamente treinado para aplicar os procedimentos de coleta salivar. Os laboratórios da área de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP possuem estrutura de segurança adequada para esta pesquisa”.

Quanto às medidas de proteção à confidencialidade os pesquisadores informaram que “Todos os tubos com as amostras de saliva de cada voluntário serão codificados pelo pesquisador envolvido na coleta. Os voluntários não serão identificados nas publicações e outras formas de divulgação dos resultados científicos”.

Quanto à previsão de ressarcimento de gastos os pesquisadores informaram que “Os voluntários não terão gastos com a participação desta pesquisa, uma vez que os mesmos estarão na Faculdade de Odontologia de Piracicaba por outros motivos, sendo que os horários de coleta de sangue serão agendados para os horários mais convenientes para os mesmos”.

Quanto à previsão de indenização e/ou reparação de danos os pesquisadores informaram que “Como mencionado, os riscos associados à participação voluntária de coleta de saliva são mínimos, não havendo previsão de indenização ou reparação de danos”.

Quanto aos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa os pesquisadores informaram que “Por não envolver procedimentos que causem possíveis danos ou efeitos colaterais aos voluntários desta, o presente projeto de pesquisa só será encerrado ao final do período experimental”.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A FR foi apresentada preenchida (6 participantes, sendo a FAPESP o patrocinador principal) e assinada pelo pesquisador responsável (Dr Victor Aragão Abreu de Freitas) e pelo Diretor da FOP-UNICAMP (Dr. Francisco Haiter Neto).

A capa do projeto cita os dados solicitados pelo CEP-FOP.

Foi apresentada a declaração dos pesquisadores, adequadamente preenchida e assinada.

Foi apresentada a declaração da instituição, adequadamente preenchida e assinada.

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

Foi apresentada a autorização de acesso e uso do Consultório de pesquisa clínica da área de Bioquímica da FOP-UNICAMP, assinada pela Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury.

Comentário – Os pesquisadores devem obter e manter em arquivo até o final do estudo a autorização para acesso e uso dos Microscópios Eletrônicos de Varredura e Confocal.

O modelo de TCLE foi apresentado e está adequado.

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco? Sim Justificativa: As amostras de saliva coletadas dos voluntários serão esterilizadas por filtração e então armazenadas a -70 °C, somente para uso em experimentos de formação de biofilmes de *S. sanguinis* na presença de saliva humana esterilizada por filtração em membranas com poros de 0,22 um de diâmetro. Com o biorrepositório, estes experimentos poderão ser realizados em dias diferentes da coleta de saliva dos voluntários. Assim, eliminaremos a necessidade de realizar as coletas de saliva nos mesmos dias da realização dos ensaios laboratoriais, o que oferecerá maior flexibilidade e conforto aos voluntários para agendamento das coletas e facilitará a programação dos experimentos pelos pesquisadores. Os componentes salivares são estáveis, quando armazenadas a -70 °C. As amostras serão armazenadas durante a duração deste projeto, o suficiente para cumprirmos o cronograma de realização da pesquisa. Após este período, as amostras serão inativadas e descartadas segundo protocolos de biossegurança adequados.

Foi apresentado o regulamento de Biorrepositório relativo às amostras que serão coletadas neste protocolo. O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa terá custo de R\$ 18.000,00, para aquisição de material de consumo e que será bancada pela FAPESP.

A pesquisa foi classificada na Grande Área 4 (Ciências da Saúde) e tem como título público “Análises da participação dos genes envolvidos na produção de DNA extracelular e exopolissacarídeos na formação de biofilmes por *S. sanguinis*”.

A pesquisa não foi classificada nas áreas temáticas especiais. A Instituição proponente da pesquisa é a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp e não foi listada Instituição Coparticipante.

### Recomendações:

As recomendações a seguir não são pendências e podem ou não ser aplicáveis ao protocolo em tela. Não há necessidade de resposta às mesmas. RECOMENDAÇÃO 1- É obrigação do pesquisador desenvolver o projeto de pesquisa em completa conformidade com a proposta apresentada ao CEP. Mudanças que venham a ser necessárias após a aprovação pelo CEP devem ser comunicadas na forma de emendas ao protocolo por meio da PB. RECOMENDAÇÃO 2- Após a aprovação do protocolo de pesquisa os pesquisadores devem atentar para a necessidade de envio de relatórios

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

parciais de atividade (no mínimo um a cada 12 meses) e do relatório final de atividade (ao término da pesquisa). Os pesquisadores devem informar e justificar ao CEP a eventual necessidade de interrupção ou interrupção total ou parcial da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 3- Reforça-se a necessidade do registro de Biorrepositórios para as amostras biológicas coletadas e que não sejam de uso imediato. A intenção deve ser registrada no projeto, no Regulamento do Biorrepositório e no TCLE que será assinado pelo participante. RECOMENDAÇÃO 4- Os pesquisadores devem atentar para a necessidade de aplicação de TCLE para coleta de amostras a serem estocadas em Biobancos e Biorrepositórios e para a necessidade de aplicação de novo TCLE quando da realização de novas pesquisas com o material estocado. RECOMENDAÇÃO 5- Pesquisas com dentes doados por profissionais de saúde ainda são toleradas em hipótese pelo CEP-FOP, mas os pesquisadores devem estar cientes de que esta solução dista do ideal ético de consulta direta ao participante por meio de TCLE específico da pesquisa ou da obtenção dos dentes a partir de um Biobanco de dentes e que estas últimas situações deveriam ser escolhidas em substituição à primeira. RECOMENDAÇÃO 6- Os pesquisadores devem manter os arquivos de fichas, termos, dados e amostras sob sua guarda por pelo menos 5 anos após o término da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 7- Destaca-se que o parecer consubstanciado é o documento oficial de aprovação do sistema CEP/CONEP e os certificados emitidos pela secretaria do CEP-FOP, a pedido, após a aprovação final do protocolo, só têm valor simbólico e devem ser evitados. RECOMENDAÇÃO 8- Intercorrências e eventos adversos devem ser relatados ao CEP-FOP por meio da PB. RECOMENDAÇÃO 9- Os pesquisadores devem encaminhar os resultados da pesquisa para publicação e divulgação, com devido crédito a todos que tenham colaborado com a realização da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 10- O parecer do CEP-FOP é fortemente baseado nos textos do protocolo encaminhado pelos pesquisadores e pode conter inclusive trechos transcritos literalmente do projeto ou de outras partes do protocolo. Trata-se, ainda assim, de uma interpretação do protocolo. Caso algum trecho do parecer não corresponda ao que efetivamente foi proposto no protocolo, os pesquisadores devem se manifestar sobre esta discrepância. A não manifestação dos pesquisadores será interpretada como concordância com a fidedignidade do texto do parecer no tocante à proposta do protocolo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências por resolver (vide texto acima).

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Parecer de aprovação de Protocolo emitido "ad referendum" conforme autorização do Colegiado na reunião de 08/05/2019. Será submetido para homologação na reunião de 12/06/2019.

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 3.365.892

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CEPCompleto.pdf	07/05/2019 08:59:11	jacks jorge junior	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1332708.pdf	06/05/2019 16:43:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2Projeto.pdf	06/05/2019 16:42:32	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_biorrepositorio.pdf	12/04/2019 08:23:36	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	54AltInfra.pdf	12/04/2019 08:23:22	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	52Declnst.pdf	12/04/2019 08:22:36	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	51DecPesq.pdf	12/04/2019 08:20:48	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4TCLE.pdf	12/04/2019 08:20:13	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito
Brochura Pesquisa	4Comentarios.pdf	12/04/2019 08:19:57	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito
Folha de Rosto	1Folhaderosto.pdf	10/04/2019 22:11:09	VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PIRACICABA, 03 de Junho de 2019

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

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



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



Piracicaba, 07 de fevereiro de 2020.

À Comissão Interna de Biossegurança  
 Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

Ref. Requerimento no. 003/2019

Solicito junto à **Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (CIBio-FOP)**, solicito alterações no projeto intitulado “Análises da participação dos genes envolvidos na produção de DNA extracelular e exopolissacarídeos na formação de biofilmes por *Streptococcus sanguinis*”, referente ao **requerimento nº. 003/2019**. Estas são encaminhadas como a versão 2 do referido requerimento e envolvem a inclusão de novos mutantes isogênicos obtidos ou a serem construídos a partir das cepa *S. sanguinis* SK36, os quais serão defectivos nos seguintes genes: *nox*, *swan*, *srtA*, *pepO*, *cppA*, *covR*, *vicK*, *sptR* ou *sptR*. Esclareço que alguns destes mutantes foram obtidos em projeto anterior autorizado pela CIBio-FOP (requerimento A001/2018), cuja vigência terminou em 31 de dezembro de 2019. Solicito também a inclusão de nova cepa parental *S. sanguinis* (SK330), para obtenção de mutantes dos mesmos genes utilizando-se as mesmas estratégias descritas para a cepa SK36. Novos ensaios para determinação da deposição de proteínas do sistema complemento e opsonofagocitose, através de análises *in vitro* de citometria de fluxo também foram incluídas nas alterações. Além disto, solicito a inclusão do aluno de doutorado, Hassan Naveed, do Programa de Biologia Buco-Dental da Área de Microbiologia e Imunologia, como membro da equipe técnica, o qual obteve capacitação em Biossegurança com aprovação da CIBio-FOP no segundo semestre de 2019. Para isto, encaminho respeitosamente para a análise da CIBio-FOP, a versão 2 do Requerimento nº. 003/2019, com todas as alterações acima descritas.

Atenciosamente,

**Pesquisadora responsável**

Prof. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner  
 Depto. de Diagnóstico Oral – Área de Microbiologia e Imunologia  
 Matrícula nº. 296098; tel. 19 2106 5379

*Prof. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner*  
 Prof. Associado I – Matr. 29.609-8  
 Área de Microbiologia e Imunologia  
 FOP/UNICAMP



Comissão Interna de Biossegurança

Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner  
Presidente da CIBio

Área de Microbiologia e Imunologia - Matrícula: 29609-8  
Departamento de Diagnóstico Oral – FOP/UNICAMP  
E-mail: [cibiofop@unicamp.br](mailto:cibiofop@unicamp.br) – Telefone: (19) 2106-5379 / (19) 2106-5349