

**DANIELA ELEUTERIO DA LUZ**

**ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE FOSFATO  
INORGÂNICO (Pst) NA FISIOLOGIA E PATOGÊNESE DE  
*Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação do Departamento  
de Microbiologia do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título  
de Mestre em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia  
Café Ferreira.

São Paulo  
2010

## RESUMO

LUZ, D. E. **Estudo do papel do sistema de captação de fosfato inorgânico (Pst) na fisiologia e patogênese de *Streptococcus mutans***. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O fosfato inorgânico é um composto essencial por estar relacionado com diversos processos metabólicos e biossíntese de moléculas relevantes à sobrevivência celular. Em bactéria são conhecidos dois tipos principais de transportadores específicos de fosfato inorgânico, o sistema Pit, de baixa afinidade, e o sistema Pst de alta afinidade, um ABC transportador, ativado sob carência de fosfato extracelular. O papel deste sistema na fisiologia e patogênese de *Streptococcus mutans*, o principal agente etiológico da cárie dental, foi estudado neste trabalho. Os genes que codificam o sistema Pst de *S. mutans* UA159, estão organizados em um óperon policistrônico (*pstS*, *pstC1*, *pstC*, *pstB*, *smu.1134* e *phoU*). A análise das sequências de aminoácidos das proteínas do sistema Pst de *S. mutans* com ortólogos do gênero *Streptococcus* demonstrou maior identidade com bactérias da cavidade oral. Análise de prevalência do gene *pstS*, que codifica a proteína ligadora, demonstrou conservação entre todas as cepas laboratoriais e de origem clínicas avaliadas. A deleção de *pstS* reduziu a capacidade de incorporação de ortofosfato que se refletiu na diminuição da taxa de replicação celular em meios com diferentes concentrações de fosfato inorgânico. A mutação também reduziu a capacidade da bactéria em aderir à superfícies abióticas e diminuiu a hidrofobicidade de superfície, além de aumentar a resistência intrínseca a pH ácido. No entanto, não houve alteração na frequência de transformação bacteriana. Por fim, o gene *pstS* de *S. mutans* foi clonado, expresso e a proteína purificada utilizada para obter anticorpos que inibiram o crescimento de *S. mutans in vitro*. Deste modo, sugere-se que o sistema Pst seja relevante na fisiologia e patogênese de *S. mutans*.

**Palavras-chave:** Sistema Pst. *Streptococcus mutans*. Importação de Pi. ABC transportador. Fosfato. PstS.

## ABSTRACT

LUZ, D. E. **Study of the role of inorganic phosphate uptake system (Pst) in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus mutans***. 2010. 87 f. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Inorganic phosphate is an essential compound related for several metabolic pathways and for the biosynthesis of molecules relevant to cellular survival. Bacteria are known to possess two main specific inorganic phosphate transporters types; the low-affinity Pit system, and the high affinity Pst system, an ABC transporter, activated by phosphate starvation. The aim of this work was to study the role of Pst system in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus mutans*, the main etiological agent of dental caries. The *S. mutans* UA159 Pst system genes are organized in a polycistronic operon (*pstS*, *pstC1*, *pstC*, *pstB*, *smu.1134* and *phoU*). The amino acid sequence analysis of Pst proteins of *S. mutans* and orthologs found among the *Streptococcus* genus, showed that highest identity values are found in oral cavity bacteria. The PstS binding protein was present in all tested *S. mutans* clinical and laboratory strains. The *pstS* mutant showed a reduced orthophosphate uptake which led to growth deficiency in different phosphate concentrations. The gene deletion also caused a reduction in bacteria adherence to abiotic surfaces, a lower cell surface hydrophobicity and a small increase in acid resistance. Otherwise, there was no change in the bacterial transformation frequency. Finally, the *S. mutans pstS* gene was cloned, expressed and the purified protein was used to obtain antibodies that inhibited the *in vitro* growth of *S. mutans*. Taking together, these results suggest that the Pst transport system plays an important role in physiology and pathogenesis *S. mutans*.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*. Pst System. ABC transporters. Phosphate. PstS.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Streptococcus mutans*

A bactéria *Streptococcus mutans* é uma eubactéria, firmicute, imóvel, anaeróbia facultativa que se apresenta na forma de cocos pertencentes à microbiota autóctone da cavidade oral (HAMADA et al., 1980). O *S. mutans* é um dos colonizadores primários do biofilme supragengival e em conjunto com algumas espécies de *Lactobacillus*, representa o principal agente infeccioso associado à cárie dental, a patologia infecciosa mais prevalente em humanos (HARDIE, 1992; VAN HOUTE, 1994). Um aspecto importante relacionado ao microambiente oral é a variação na disponibilidade de nutrientes, o que torna necessário aos microrganismos que nela habitam, o desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência que permitam a captação de nutrientes essenciais. Essa necessidade é destacada quando da análise do genoma de *S. mutans* UA159, sequenciado em 2002 pela Universidade de Oklahoma (NC 004350), foram encontrados cerca de 280 genes - 15% do total de ORFs - codificadores de sistemas de transporte (AJDÍC et al., 2002). Os sistemas de transporte ativos da família ABC são os mais abundantes com mais de 60 transportadores, ou seja, 10% do número total de ORFs, da espécie.

Inúmeros estudos demonstram que esta bactéria possui vários fatores de virulência importantes para sua patogenicidade como: (i) sua habilidade de aderir firmemente à superfície dental; (ii) produção de ácidos a partir de um grande número de carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro (acidogenicidade); (iii) capacidade de sobreviver e replicar em ambientes ácidos (aciduricidade) (MICHALEK et al., 1981; HAMADA et al., 1984). Entre esses, destaca-se a capacidade de aderência/produção de biofilme por se tratar do passo inicial e essencial para o desenvolvimento da cárie dental. Além de permitir o contato direto da bactéria - e por conseguinte de seus produtos metabólicos - à superfície dental, o biofilme dificulta o acesso da saliva à superfície do dente, impedindo a promoção de sua ação tamponante na presença do ácido láctico produzido por *S. mutans* (HAMADA et al., 1980). A adesão de *S. mutans* à superfície dental

envolve dois passos: o primeiro estágio, chamada de sacarose-independente é reversível - garante a interação da bactéria às proteínas salivares e macromoléculas bacterianas associadas à superfície mineralizada dos elementos dentais – e se refere à adesão a película adquirida, (BURNE, 1998). Nesta etapa, adesinas bacterianas como antígeno I/II (ou proteína SpaP, ou proteína P1) são fundamentais. O segundo estágio, sacarose-dependente, caracteriza-se pela produção de glucanos insolúveis, denominados PECs que são produzidas pelas enzimas GTF a partir de sacarose e sua interação com as adesinas GBP (HAMADA et al., 1984; BOWEN et al., 1991; CROWLEY et al., 1999; RUSSELL, 2006). A capacidade dessa bactéria em aderir à superfície dental pode ser aferida, de modo indireto *in vitro*, pela aderência a superfícies abióticas, como placas de microtitulação (BERLUTTI et al., 2004).

## **1.2 Transportadores de fosfato inorgânico em bactérias**

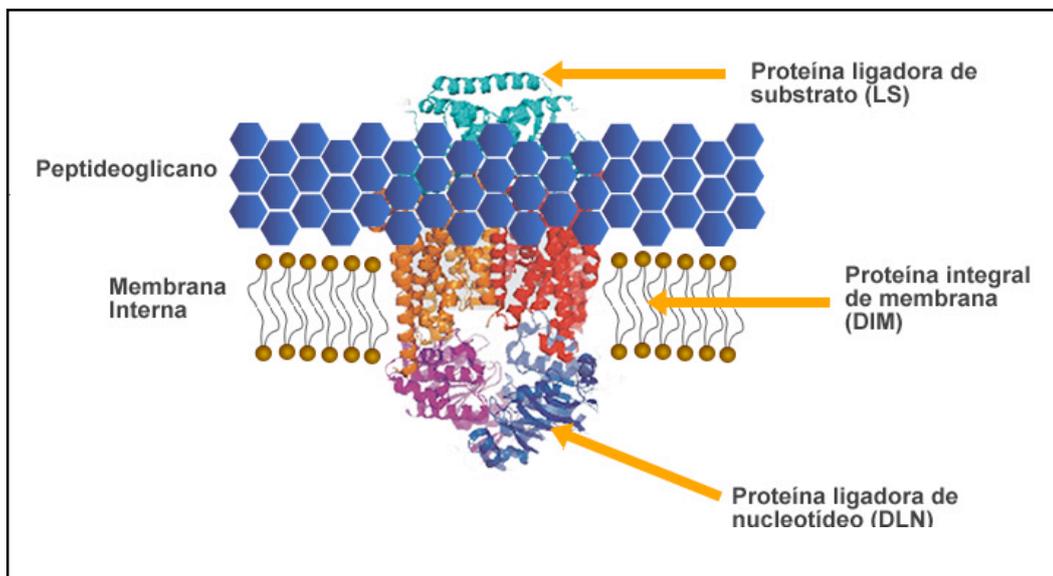
O transporte de fosfato inorgânico (Pi), em conjunto com o transporte de componentes organo-fosfatados, é essencial para o controle e regulação interna da homeostase de fosfato relacionado a fontes de energia, biossíntese de DNA, RNA e fofolípídeos (VAN VEEN et al., 1994). Os microrganismos devem acumular fósforo e nutrientes que contenham fósforo do ambiente, esses compostos devem passar pelo envelope celular antes de chegarem ao citoplasma (VAN VEEN et al., 1994). A captação de substâncias através da membrana citoplasmática, em particular de bactérias, é realizada por diferentes processos, como a difusão passiva, facilitada, ou ainda, por mecanismos de transporte ativo. Sistemas de transporte de nutrientes em bactérias, incluindo o fosfato, podem ser divididos em dois grupos: os sistemas primários e os sistemas secundários (VAN VEEN et al., 1994).

Os sistemas primários, por definição, medeiam um movimento vetorial do soluto através da membrana citoplasmática juntamente com uma reação química, são sensíveis ao choque osmótico e sua fonte de energia

vem diretamente da hidrólise de ATP, dentro deste tipo de sistemas destaca-se, os ABC transportadores.

Os transportadores do tipo ABC estão presentes nos três grandes reinos biológicos e são empregados por archea, eubactérias e eucariotos, sendo utilizados tanto para captar, como para exportar diferentes substâncias (HIGGINS, 1992; HIGGINS, 2001). Os sistemas importadores do tipo ABC são restritos às bactérias e archeas, em geral, constituem 5% dos genomas bacterianos conhecidos e são constituídos por três componentes funcionais e estruturais (Figura 1), dentre esses dois estão associados à membrana citoplasmática enquanto o terceiro mostra-se solúvel nas bactérias gram-negativas, ou associados à membrana citoplasmática nas gram-positivas (MOUTRAN et al., 2003; LINTON et al., 1998).

Os componentes associados à membrana interna são responsáveis pela formação de um poro por onde a substância será transportada, esses componentes são, em geral, formados por duas proteínas hidrofóbicas que atravessam a membrana citoplasmática, e por isso, são denominados de domínio integral de membrana (DIM) (MOUREZ et al., 1997). O segundo componente desses sistemas ABC de transporte em bactérias é representado domínios geradores de energia, que são proteínas associadas à face interna da membrana citoplasmática e ligam ATP, sendo chamadas de domínios de ligação de nucleotídeos (DLN) (YOUNG et al., 1999). O terceiro componente denominado domínio ligador de substrato (LS), é responsável pela especificidade e afinidade do sistema, sendo encontrado solúvel no periplasma de bactérias gram-negativas enquanto que em gram-positivas, são encontrados na forma de lipoproteínas ancoradas por meio de um resíduo de acil-gliceril-cisteína N-terminal à face externa da membrana citoplasmática (DASSA, 2000).

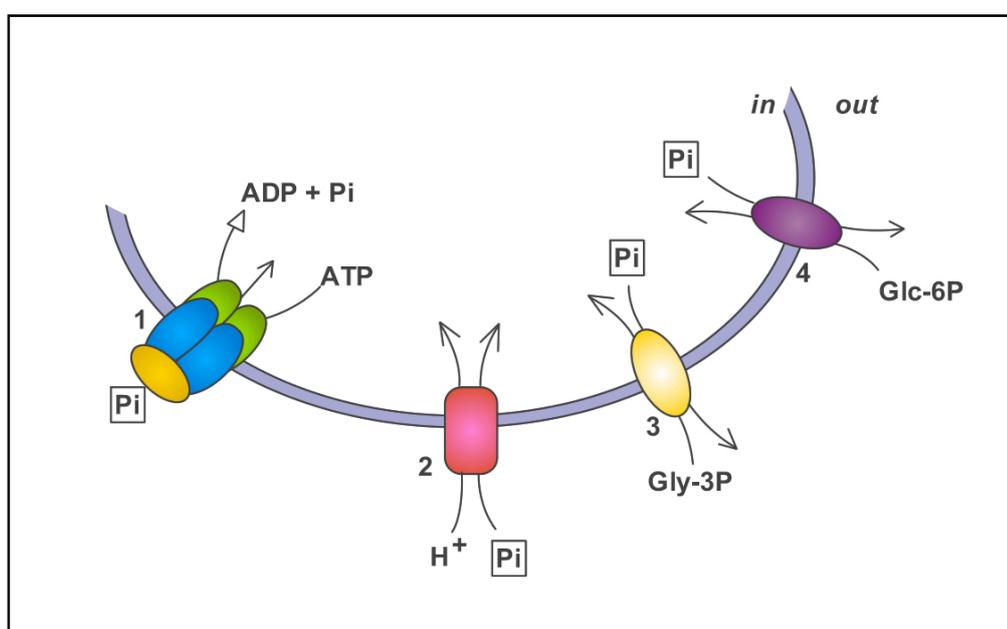


**Figura 1.** Representação esquemática de um transpotador ABC em bactéria gram-positiva. Os três domínios contituíntes de um sistema importador estão destacados.

Os sistemas secundários por sua vez, catalizam a translocação do nutriente através da membrana de maneira uniporte, simporte ou antiporte com outro soluto, sem estar associado com uma reação química, são insensíveis ao choque osmótico e utilizam o gradiente eletroquímico da membrana para extrair a energia necessária para o seu funcionamento (HAROLD, 1986). Assim, enquanto transportadores primários são intrinsecamente unidirecionais, os transportadores secundários mediam fluxo de captação ou efluxo de solutos de acordo com um gradiente eletroquímico predito (KONINGS et al., 1994).

Em *Escherischia coli* são conhecidos quatro sistemas de transporte de fosfato que podem ser classificados com base na especificidade ao substrato, bioenergética e critérios estruturais (Figura 2) (VAN VEEN, 1997). O sistema Pst e o sistema Pit são específicos para fosfato inorgânico e são controlados pelo seu movimento. Há também dois sistemas de transporte de fosfato inorgânico mediados por troca iônica, onde o fosfato inorgânico é aceito como um análogo de um organo-fosfato, como os sistemas que transporta *sn*-glicerol-3-fosfato (GlpT) e o transportador de Glicose-6-fosfato (UhpT) (LARSON, 1987; MALONEY et al., 1990). Pit, GlpT e UhpT são considerados sistemas de transporte secundários. Pit funciona como um sistema simporte  $H^+$ / soluto. GlpT e

UhpT são sistemas antiporte que acopla a acumulação de açúcares fosfatados à liberação de fosfato sob condições fisiológicas (AMBUDKAR et al., 1986; SONNA et al., 1988). Pit, GlpT e UhpT não utilizam uma proteína ligadora periplasmática e aparentemente consistem em uma única proteína transmembrânica (EIGLMEIER et al., 1987; ELVIN et al., 1986). O sistema Pst, por outro lado, opera como um mecanismo de transporte primário, sua estrutura é bem mais complexa, envolvendo várias proteínas de membrana, e também uma proteína ligadora de fosfato (SURIN et al., 1987).



**Figura 2.** Representação esquemática de transportadores de fosfato em *E. coli*. 1) Sistema de transporte específico de fosfato inorgânico (Pst); 2) Transportador de fosfato inorgânico (Pit); 3) Sistema antiporte de ligação ao fosfato *sn*-glicerol-3-Fosfato; 4) Sistema antiporte de ligação ao fosfato Glicose-6-Fosfato.

Fonte: Adaptado de Van Veen, 1997.

O transporte de íons fosfato via Pit, Pst, GlpT e UhpT em *E. coli* tem geralmente sido interpretada em termos de translocação de fosfato monobásico ou dibásico. Assim, Pst mediará a translocação de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  (ROSENBERG, 1987). Os antiporters ligadores de fosfato GlpT e UhpT medeiam a troca eletroneutra de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , ânions organo fosfatos ou ambos (MALONEY et al., 1990). Em adição, é geralmente assumido que  $\text{HPO}_4^{2-}$  é a espécie de íon fosfato que é transportado por Pit (VAN VEEN, 1997).

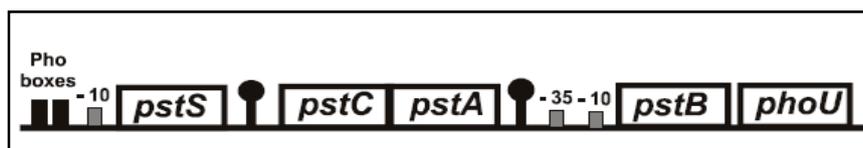
Mais recentemente, tem sido descrito em bactérias como *E. coli* e *Mycobacterium smegmatis*, um segundo sistema pertencente à família ABC com afinidade a fosfito/fosfato, regulado pela baixa concentração destes compostos, conhecido como sistema Phn, que é codificado por um óperon de três genes, possuindo grandes semelhanças com o sistema Pst, sendo sugerido substituí-lo no transporte de fosfato, quando este está ausente (GEBHARD et al., 2006; ELASHVILI et al., 1998).

### 1.3 Sistema Pst de transporte de fosfato inorgânico

O sistema Pst de transporte pertence a grande família dos ABC transportadores, e se caracteriza por possuir uma alta afinidade ao fosfato inorgânico (HIGGINS et al., 1990).

A caracterização desse transportador em *E. coli* mostrou que este é codificado por um óperon policistrônico contendo cinco genes, sendo que quatro codificam os componentes estruturais do sistema de transporte (Figura 3).

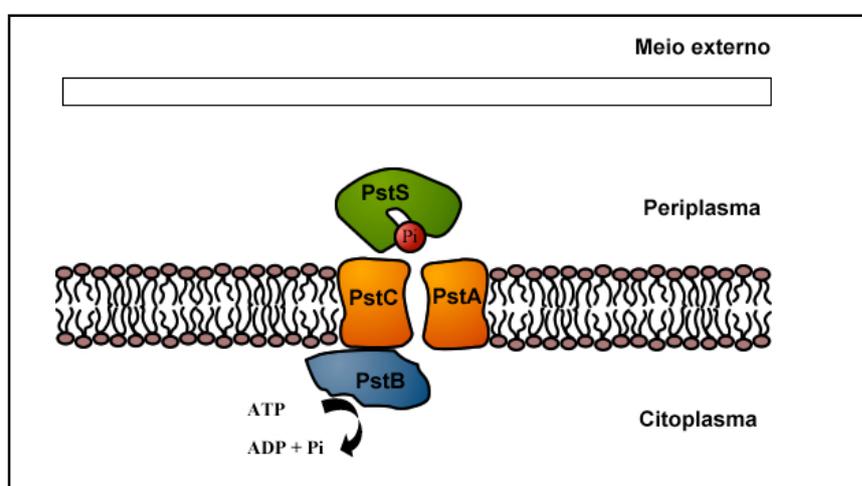
O primeiro cístron consiste no gene *pstS* e codifica a proteína ligadora de fosfato, caracterizada pela alta afinidade e especificidade a esse íon. A jusante são encontrados os genes *pstA* e *pstC*, que codificam proteínas hidrofóbicas com seis hélices transmembrânicas e são responsáveis pela formação do poro pelo qual o fosfato passa após ser ligado por PstS. Análises mutacionais de PstA e PstC sugerem que o fosfato é translocado através delas via “cadeia de fosfato” formada por uma ponte salina contendo três resíduos de arginina/glutamato (ou aspartato). É necessário o movimento participativo das hélices de PstA e PstC para abrir ou fechar o canal de fosfato, isto é ativado pela isomerização cis-trans de dois pares de resíduos de cisteína energizadas pelo ATP hidrolizado por PstB (BRANDL et al., 1986; WEBB et al., 1992). PstB consiste na proteína ligadora de nucleotídeo, pois possui os motivos de ligação ao ATP (Walker A e Walker B) codificada pelo cístron seguinte à *pstC* (Figura 4). PstB interage com PstA e/ou PstC na sua face citoplasmática, e por analogia a outros sistemas ABC transportadores, provavelmente funciona como um dímero (WANNER, 1993).



**Figura 3.** Organização do operon *pst* em *E. coli*.

Fonte: AGUENA, 2007.

O último cístron do operon, *phoU*, codifica uma proteína periférica de membrana, e seu papel no transporte de fosfato ainda é controverso, embora estudos sugiram que esta proteína regule negativamente o regulon fosfato (Pho) (BUCKLES et al., 2006).



**Figura 4.** Modelo esquematizado do sistema Pst em *E. coli*.

Fonte: Adaptado de Dassa et al., 2000.

Os genes *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU* possuem sua expressão altamente regulada. O promotor de *pstS* é pouco expresso em seus níveis basais, quando o fosfato inorgânico está presente em excesso no ambiente, porém, mostra uma ativação de 100 vezes na expressão quando há carência deste nutriente (METCALF et al., 1991). O operon *pst* é parte do regulon Pho, que consiste em aproximadamente 33 genes, denominados de PSI, cujos os produtos agem primariamente na assimilação de fosfato do ambiente (WANNER, 1993).

O regulon Pho é representado por um sistema de dois componentes sendo uma proteína sensora (PhoB) e uma proteína reguladora transcricional (PhoR) que na carência de fosfato ativa a transcrição dos

genes pertencentes ao regulon, através de sua ligação à sequências específicas localizadas nas regiões promotoras dos genes denominadas *Pho boxes* (NOVAK et al., 1999; WANNER, 1995). Estudos sugerem que o sistema Pst está ligado a mecanismos moleculares que levam a desativação do regulon Pho, interferindo na expressão dos genes ligados a ele (LAMARCHE et al., 2008; WANNER, 1996; RAO et al., 1990)

#### 1.4 Pleiotropismo do sistema Pst

Além do papel primordial na incorporação de Pi em condições de escassez do nutriente, o sistema Pst de transporte está relacionado a mecanismos de virulência em diversos patógenos (LAMARCHE et al., 2008). De fato, segundo Jacobsen et al. (2008), mutantes *pstA* e *pstS* mostraram constutividade na expressão de genes do regulon Pho, demonstrando o papel repressor do óperon *pst* sobre esse regulon.

Efeitos pleiotrópicos do óperon *pst* foram demonstrados em várias linhagens de *E. coli*. Na linhagem aviária patogênica, a inativação do sistema Pst reduziu significativamente o número de lesões extra-intestinais nas aves, além da perda de resistência ao soro de coelho e ao choque ácido. Em enteropatogênica de porcos, mutantes *pst* tiveram adesão aos enterócitos e patogenicidade significativamente menor quando comparada à linhagem selvagem. (LAMARCHE et al., 2005; DAIGLE et al., 1995; BATISSON et al., 2003). Já em linhagem extraintestinal, mutantes *pst* tiveram uma perda na produção de polissacarídeos de superfície e tornaram-se totalmente não patogênicas. Em *E. coli* uropatogênica, mutações no gene *phoU* causaram diminuição de 100 vezes na capacidade de colonizar o trato urinários de camundongos (LAMARCHE et al., 2008; BAHRANI-MOUGEOT et al., 2002; BUCKLES et al., 2006). Ao contrário de outras linhagens, uma inserção entre os genes *pstA* e *pstB*, em *E. coli* enteroinvasiva aumentou cerca de cinco vezes o nível de invasão à células epiteliais humanas *in vitro*, tornando a bactéria hiper-invasiva” (SINAI et al., 1993).

Em *Shigella flexneri*, outra bactéria entérica, mutações no óperon *pst* acarretaram em uma diminuição da virulência quando comparadas com

linhagens selvagens (RUNYEN-JANECKY et al., 2005). Srinivasa Rao et al. (2003, 2004), relataram que em um modelo de infecção em peixes, mutações nos genes *pstC*, *pstB* e *pstS* atenuaram significativamente a virulência da bactéria *Edwardsiella tarda*, causadora de infecção intestinal em humanos e septicemia em peixes.

No patógeno extra-intestinal *Proteus mirabilis*, mutações nos genes *pstS* e *pstA*, levaram à competição deficiente pela colonização na urina, bexiga e rins de camundongos quando comparados com a linhagem selvagem (BURALL et al., 2004; JACOBSEN et al., 2008). Além disso, mutantes *pst* se mostraram atenuados em modelos de infecção urinária *in vivo*, pela deficiência na produção de biofilme, deficiência essa também relatada em mutantes *pst* de *Pseudomonas aureofaciens*. Em *P. mirabilis*, o sistema Pst regula negativamente a formação de biofilme, sendo portanto, importante para sua patogênese (O'MAY et al., 2009; MONDS et al., 2001).

Dentro do gênero *Streptococcus*, foi observado que a mutagênese no gene *pstB* resultou na redução da capacidade de captar fosfato, na frequência de transformação e na patogenicidade em modelo de septicemia em murinos na bactéria (POLISSI et al., 1998; NOVAK et al., 1999).

Soualhine et al. (2005) relataram a relação do sistema Pst com a resistência à penicilina em *S. pneumoniae*, onde a inativação do gene *pstS* levou a um aumento de duas vezes na susceptibilidade à penicilina nas linhagens estudadas. Além disso, mutação no gene *pstB* mostrou diminuição tanto na competência quanto na capacidade de produzir biofilme, prejudicando a adesão do pneumococo ao epitélio respiratório.

## 6 CONCLUSÕES

- *S. mutans* UA159 possui uma única cópia do óperon *pst* contendo seis cístrons que codificam um sistema de captação de fosfato. Esse óperon é homólogo ao encontrado em *E. coli*, assim como em outras espécies do gênero *Streptococcus*, além de possuir uma organização conservada no gênero;
- O gene *pstS* esta presente em todas linhagens clínicas e laboratorias de *S. mutans* testadas;
- A captação de fosfato foi reduzida parcialmente na cepa DL1 indicando a atuação de um sistema alternativo independente de Pst;
- A deleção do gene *pstS* leva a um crescimento deficiente mesmo em concentração de fosfato considerada alta como 30 mM;
- O mutante DL1 não apresentou alteração na frequência de transformação, independente da presença de CSP;
- A linhagem mutante teve a capacidade de adesão e perfil hidrofóbico de superfície diminuído, o que prejudicaria a colonização e a formação de biofilme;
- A linhagem DL1 mostrou capacidade de resistência ao pH ácido aumentada em relação à selvagem, porém de maneira não significativa;
- A proteína PstS foi expressa e purificada com sucesso e anticorpos policlonais foram obtidos em camundongos BALB/C;
- Os anticorpos anti-PstS produzidos mostraram uma ação de redução de crescimento sobre *S. mutans* UA159
- Os resultados sugerem que o sistema Pst de transporte apresentasse relevante para a sobrevivência e virulência de *S. mutans*, mesmo na presença de sistemas alternativos de transporte de Pi.

**REFERÊNCIAS \***

AGUENA, M.; YAGIL, E.; SPIRA, B. Transcriptional analysis of the *pst* óperon of *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 268, n. 4, p. 518-524, 2002.

AJDÍC D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; J. I. A. H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, n. 22, p.14494-14439, 2002.

AHN, S. J.; LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159. **Journal os Bacteriology**, v.187, n. 9, p. 3028-3038, 2005.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLASP: a new generation of protein database search programs. **Nucleics Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMBUDKAR, S. V.; LARSON, T. J.; MALONEY, P. C. Reconstitution of sugar phosphate transport systems of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 20, p. 9083–9086, 1986.

ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 741-746, 1961.

BAHRANI-MOUGEOT, F. K.; BUCKLES, E.; LOCKATELL, C. V.; HEBEL, J. R.; JOHNSON, D. E.; TANG, C. M.; DONNENBERG, M. S. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1079-1093, 2002.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1267-1277, 2004.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS: **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BATISSON, I.; GUIMOND, M. P.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J. M.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8. P. 4516-4525, 2003.

BERLUTTI, F.; AJELLO, M.; BOSSO, P.; MOREA, C.; PETRUCCA, A.; ANTONINI, G.; VALENTI, P. Both lactoferrin and iron aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **BioMetals**, v. 17, n. 3, p. 271-278, 2004.

BOWEN, W. H.; SCHILLING, K. M.; GIERTSEN, E.; PERSON, S.; LEE, S. F.; BLEIWEIS, A. S.; BEEMAN, D. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. **Infection and Immunity**. V. 59, n. 12, p. 4606-4609, 1991.

BRANDL, C. J.; DEBER, C. M. Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 83, n. 4, p. 917-921, 1986.

BRYAN, E. M.; BAE, T.; KLEEREBEZEN, M. DUNNY, G. M. Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. **Plasmid**, v. 44, n. 2, p. 183-190, 2000.

BUCKLES, E. L.; WANG, X.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; DONNENBERG, M. S. PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 153-160, 2006.

BURALL, L. S.; HARRO, J. M.; LI, X.; LOCKATELL, C. V.; HIMPSL, S. D.; HEBEL, J. R.; JOHNSOS, D. E.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2922-2938, 2004.

BURNE, R. A.; SCHILLING, K.; BOWEN, W. H.; YASBIN, R. E. Expression, purification, and characterization of an exo- $\beta$ -D-fructosidase of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 10, p. 4507-4517, 1987

BURNE, R.A. Oral streptococci...products of their environment. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 3, p. 445-452, 1998.

BULLOCK, P. A. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. **Bio Techniques**, v.5, p. 376-379, 1987.

CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; MICHALEK, S. M.; BLEIWEIS, A. S. Virulence of a *spaP* mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1201-1206, 1999.

DAIGLE, F.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4924-4927, 1995.

DASSA, E. ABC transport. In: LEDDENBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**. v.1, p. 1-12, 2000.

DURFEE, T.; NELSON, R.; BALDWIN, S.; PLUNKETT, G. 3RD.; BURLAND, V.; MAU, B.; PETROSINO, J. F.; QIN, X.; MUZNY, D. M.; AYELE, M.; GIBBS, R. A.; GSÖRGO, B.; PÓSFAL, G.; WEINSTOCK, G. M.; BLATTNER, F. R. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597-2606, 2008.

EIGLMEIER, K.; BOOS, W.; COLE, S. T. Nucleotide sequence and transcriptional startpoint of the *glpT* gene of *Escherichia coli*: extensive sequence homology of the G-3-P transport protein with components of the H-6-P transport system. **Molecular Microbiology**, v. 1, p. 251-258, 1987.

ELASHVILI, I; DEFRANK, J. J.; CULOTTA, V. C. *phnE* and *glpT* genes enhance utilization of organophosphates in *Escherichia coli* K-12. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2601-2608, 1998.

ELVIN, C. M.; DIXON, N. E.; ROSENBERG, H. Molecular cloning of the phosphate (inorganic) transport (*pit*) gene of *Escherichia coli* K-12. Identification of the *pit* gene product and physical mapping of the *pit-gor* region of the chromosome. **Molecular and General Genetics**, v. 204, p. 477-484, 1986.

GARCÍA-GODOY, F.; HICKS, M. J.; Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 25-34, 2010.

GEBHARD, S.; TRAN, S. L.; COOK, G. M. The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: A second high-affinity ABC-transporter for phosphate. **Microbiology**, v. 152, n. 11, p. 3453-3464, 2006.

GIBBONS, R. J.; ETHERDEN, I. Comparative hydrophobicities of oral bacterial and their adherence to salivary pellicles. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1190-1196, 1983.

HAMADA, S.; SLADE H. D. Biology, immunology and carcinogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Review**, v. 44, n. 2, p. 331-384, 1980.

HAMADA, S., KOGA, T., OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, n.3, p. 407-411, 1984.

HARDIE, J. M. Oral Microbiology: Current Concepts in the microbiology of dental carie and periodontal disease. **Brazillian Dental Journal**, v. 172, n. 7, p. 271-278, 1992

HAROLD, F. M. **The vital force**: a study of bioenergetics. New York: Free- man WH & Company, 1986

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 67-113, 1992.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: phisiology, structure and mechanism – an overview. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 205-210, 2001.

HORAUD, T.; DELBOS, F. Viridans streptococci in infective endocarditis: species distribution and susceptibility to antibiotics. **European Heart Journal**, v. 5, p. 39-44, 1984.

JACKSON, R. J.; BINET, M. R. B.; LEE, L.; MA, R.; GRAHAN, A. I.; MCLEOD, C. W.; POOLE, R. K. Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. **FEMS Microbiology Letters**, v. 289, n. 2, p. 219-224, 2008.

JACOBSEN, S. M.; LANE, M. C.; HARRO, J. M.; SHIRLIFF, M. E.; MOBLEY, H. L. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 2, p.180-193, 2008.

KEEN, J. N.; FINDLAY, J. B. C. Protein sequencing techniques Molecular Biology and Biotechnology. **A comprehensive desk reference**. ed. Robert A Meyers **VCH Publish**. p. 771-773, 1995.

KONINGS, W. N.; POOLMAN, B.; VAN VEEN, H. W. Solute transport and energy transduction in bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65, n. 4, p. 369–380, 1994.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **Journal of Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 69-85, 1970.

LAMARCHE, M. G.; DOZOIS, C. M.; DAIGLE, F.; CAZA, M.; CURTISS, R. III.; DUBREUIL, J. D.; HAREL, J. Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4138-4145, 2005.

LAMARCHE, M. G.; WARNNER, B. L.; CRÉPIN, S.; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 461-473, 2008.

LARSON, T. J. *glpT*-Dependent transport of *sn*-glycerol-3- phosphate in *Escherichia coli* K-12. In: TORRIANI-GORINI, A.; ROTH-MAN, F. G.; SILVER, S.; WRIGHT, A.; YAGIL, E. **Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987. p. 164–169.

LEMOS, J. A.; BROWN, T. A. Jr.; BURNE, R. A. Effect of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p.1431-1440, 2004.

LINTON, K. J.; HIGGINS, C. F. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 5-13, 1998.

LOO, C. Y.; CORLISS, D. A.; GACESHKUMAR, N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. **Journal Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1374-1382, 2000.

LUOMA, H. Uptake of phosphate by caries-active and caries-inactive Streptococci. **Archives of Oral Biology**, v. 13, n. 11, p. 1331-1342, 1968.

MALONEY, P. C.; AMBUDKAR, S. V.; ANANTHARAM, V.; SONNA, L. A.; VARAD-HACHARY, A. Anion-exchange mechanisms in bacteria. **Microbiology Review**, v. 54, p. 1-17, 1990.

METCALF, W. W.; WANNER, B. L. Involvement of the *Escherichia coli* *phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, P esters, and P. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 3, p. 587-600, 1991.

MICHALEK, S. M.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H.; OCHIAI, K.; MCGHEE, J. R. Oral Ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infection and Immunity**, v. 33, n. 3, p. 690-696, 1981.

MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics**: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Nova York: Cold Spring Harbor, 1992.

MOFFATT, B. A. ; STUDIER, F. W. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. **Cell Press** , v. 49, n. 2, p. 221-227. (1987).

MONDS, R. D.; SILBY, M. W.; MAHANTY, K. H. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 415-426, 2001.

MOUREZ, M.; HOUFNUNG, J.; DASSA, E. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. **EMBO Journal**, v. 4, n. 11, p. 2287-2293, 1997.

MOUTRAN, A.; QUAGGIO, R. B.; BALAN, A.; FERREIRA, L.C.S.; FERREIRA, R.C.C. The oligopeptide (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv.citri. **Current Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 354-359, 2003.

MURASHIMA, K.; CHEN, C. L.; KOSUGI, A.; TAMARU, Y.; DOI, R. H.; WONG, S. L. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 76-81, 2002.

NEMOTO, H.; NAKANO, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the heart valve of an infective endocarditis patient. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 891-895, 2008.

NEPOMUCENO, R. S. L.; TAVARES, M. B.; LEMOS, J. A.; GRISWOLD, A. R.; RIBEIRO, J. L.; BALAN, A.; GUIMARÃES, K. S.; CAI, S.; BURNE R. A.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. The oligopeptide (*opp*) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence and characterization. **Oral Microbiology Immunology**, v. 22, n. 4, p. 277-284, 2007

NOMURA, R.; NAKANO, K.; NEMOTO, H.; FUJITA, K.; INAGAKI, S.; TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI, K.; TAKEDA, M.; YOSHIOKA, H.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1135-1140, 2006.

NOVAK, R.; CAUWELS, A.; CHARPENTIER, E.; TUOMANEN, E. Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1126-1133, 1999.

NGUYEN, H. D.; PHAN, T. T. P.; SCHUMANN, W. Expression Vectors for the Rapid Purification of Recombinant Proteins in *Bacillus subtilis*. **Current Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 89-93, 2007.

O'MAY, G. A.; JACOBSEN, S. M.; LONGWELL, M.; STOODLEY, P.; MOBLEY, H. L.; SHIRTLIFF, M. E. The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1523-1535, 2009.

ORIHUELA, J. C.; MILLS, J.; ROBB, C.W.; WILSON, C. J.; WATSON, D. A.; NIESEL, D. W. *Streptococcus pneumoniae* PstS production is phosphate responsive and enhanced during growth in the murine peritoneal cavity. **Infection and immunity**, v. 69, n. 12, p. 7565-7571, 2001.

PERRY, D.; WONDRACK, L. M.; KURAMITSU, H. K. Genetic transformation of putative cariogenic properties in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 722-727, 1983.

POLISSI, A.; PONTIGGIA, A.; FERGER, G.; ALTIERI, M.; MOTLL, H.; FERRARI, L.; SIMON, D. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5620-5629, 1998.

PRATT, J. T.; ISMAIL, A. M.; CAMILI, A. PhoB regulates both environmental and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1595- 1605, 2010.

RAO, N. N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1083-1090, 1990.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.

ROSENBERG, H. Phosphate transport in prokaryotes. In: ROSEN, B. P.; SILVER, S. **Ion Transport in Prokaryotes**. New York : Academic Press, 1987. p. 205–248.

RUNYEN-JANECKY, L. J.; BOYLE, A. M.; KIZZEE, A.; LIEFER, L.; PAYNE, S. M. Role of the Pst system in plaque formation by intracellular pathogen *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1404-1410, 2005.

RUSSELL, R.R.B. Pathogenesis of oral streptococci. In: FISCHETTI, V. A. **Gram-positive Pathogens**. 2. ed. Washington, D.C: AMS, 2006. p. 332-337.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SINAI, A. P.; BAVOIL, P. M. Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1125-1137, 1993.

SONNA, L. A.; AMBUDKAR, S. V.; MALONEY, P. C. The mechanism of glucose 6-phosphate transport by *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 14, p. 6625–6630, 1988.

SOUALHINE, H.; BROCHU, V.; MÉNARD, F.; PAPADOPOULOU, B.; WEISS, K.; BERGERON, M.G.; LÉGARÉ, D.; DRUMMELSMITH, J.; OUELLETTE, M. A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. **Molecular microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1430-1440, 2005.

SRINIVASA RAO, P. S.; LIM, T. M.; LEUNG, K. Y. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1343-1351, 2003.

SRINIVASA RAO, P. S.; YAMADA, Y.; TAN, Y. P.; LEUNG, K. Y. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 573-586, 2004.

STEED, P. M.; WANNER, B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 6797-6809, 1993.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199 – 210, 2008

SURIN, B. P.; COX, G. B.; ROSENBERG, H. Molecular studies on the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*. In: TORRIANI-GIRINI, A.; ROTHMAN, F. G.; SILVER, S.; WRIGHT, A.; YAG-IL, E. **Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987. p. 145–149.

TERLECKYJ, B.; WILLETT, N. P.; SHOCKMAN, G. D. Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. **Infection Immunity**, v. 11, n. 4, p. 649-655, 1975.

VAN HOUTE, J. V. Role of micro-organisms in caries etiology. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 3, p. 672-681, 1994.

VAN VEEN, H.W.; ABEE, T.; KORTSTEE, G. J.; KONINGS, W. N.; ZEHNDER, A. J. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1766-1770, 1993.

VAN VEEN, H. W. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 4, p. 299-315, 1997.

WANNER, B. L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 47-54, 1993.

WANNER, B. L. Signal transduction and cross regulation in the *Escherichia coli* phosphate regulon by PhoR, CreC, and acetyl phosphate. In: HOCH, J. A.; SILHAVY, T. J. **Two-component Signal Transduction**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1995. p. 203-221.

WANNER, B. L. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS, R. III.; INGRAHAN, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B. **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. Washington. DC: American Society for Microbiology Press, 1996. p. 1357-1381.

WEBB, D. C.; ROSENBERG, H.; COX, G. B. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24661–24668, 1992.

WILLSKI, G. R.; MALAMY M. H. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.144, n. 1, p. 356-365, 1980.

YOSHIDA, A.; KURAMITSU, H. K. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 6283-6291, 2002.

YOUNG, J.; HOLLAND, I. B. ABC transporters: Bacterial exporters-revisited five years on. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1461, n. 1, p. 177-200, 1999.