

LUCIANA KFOURI SIRIANI

**INFLUÊNCIA DO GENE *cnm* DE *Streptococcus mutans*
NA FORMAÇÃO DE BIOFILME E NA INTERAÇÃO DO
MICROORGANISMO ÀS CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

LUCIANA KFOURI SIRIANI

**INFLUÊNCIA DO GENE *cnm* DE *Streptococcus mutans* NA
FORMAÇÃO DE BIOFILME E NA INTERAÇÃO DO
MICROORGANISMO ÀS CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Siriani, Luciana Kfouri.

Influência do gene *cnm* de *Streptococcus mutans* na formação de biofilme e na interação do microrganismo às células endoteliais / Luciana Kfouri Siriani. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia oral.

Versão do título para o inglês: Influence of *cnm* gene of *Streptococcus mutans* in biofilm formation and interaction to endothelial cells.

1. *Streptococcus mutans* 2. Biofilmes 3. Colágeno
4. Células endoteliais 5. Internalização 6. Cárie dentária I.
Simionato, Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0150/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana Kfourir Siriani.

Título da Tese: Influência do gene *cnm* de *Streptococcus mutans* na formação de biofilme e na interação do microrganismo às células endoteliais.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

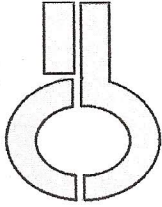
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2009.

PARECER 883/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 93ª reunião realizada em 24.03.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Expressão gênica de isolados clínicos de Streptococcus mutans durante a invasão a células endoteliais*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, com a recomendação de que seja feita, no *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*, uma descrição sucinta do procedimento para a coleta do material .

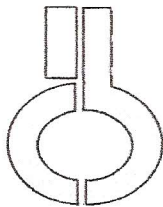
Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24 de março de 2010.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma-Sra.
LUCIANA DA SILVA KFOURI
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - telefax: (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.090/09

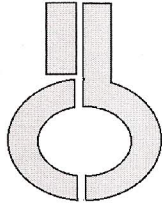
DECLARAÇÃO

Em aditamento ao Parecer 883/CEP emitido pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em sua 93ª reunião realizada em 24.03.09, informo que o projeto de pesquisa intitulado: "*Expressão gênica de isolados clínicos de Streptococcus mutans durante a invasão a células endoteliais*", está sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. Maria Regina L. Simionato e a pesquisadora Luciana da Silva Kfourri.

São Paulo, 11 de setembro de 2009

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

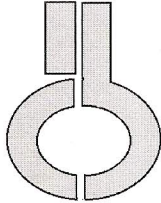
Decl. CEP SH.040 /12.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao PARECER 883/CEP, de 24-março-2009, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Influência do gene *cnm* de *Streptococcus mutans* na formação de biofilme e na alteração do microorganismo às células endoteliais*" sob responsabilidade dos autores *Profa. Dra. Maria Regina L. Simionato e a pesquisadora Luciana da Silva Kfour*, não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 13 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.041 /12.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao PARECER 883/CEP, de 24-março-2009, declaro que esta Comissão não faz restrições às alterações propostas para o Projeto intitulado "*Influência do gene *cnm* de *Streptococcus mutans* na formação de biofilme e na alteração do microorganismo às células endoteliais*" sob responsabilidade dos autores *Profa. Dra. Maria Regina L. Simionato e a pesquisadora Luciana da Silva Kfourir*, não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 17 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

**Às minhas filhas Malika
e Jamile e ao meu
marido Fernando**

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Nesses últimos cinco anos eu dediquei metade da minha vida à realização desse trabalho. Além disso, durante esse período, minha vida atingiu uma intensidade ímpar. Eu me casei, tive minha segunda filha, Jamile, vi a primogênita Malika aprender a ler e a escrever, mudar de escola, adaptar-se a sua nova vida, compramos e reformamos nossa casa, agregamos outro cachorro, comecei a trabalhar em outro consultório, engordei, entrei nos quarenta, enfim, levei a vida que qualquer um leva tudo isso na metade do tempo normal! Brincadeiras à parte, eu devo muito do que está aqui a algumas pessoas que literalmente são a minha existência.

Do fundo da minha alma e do meu coração, eu agradeço a felicidade de ter ao meu lado meu marido, Fernando. Sem ele nada do que está aqui seria possível. Apesar de não estar nunca em casa, de quase todos os fins de semana eu ter de ir ao laboratório, da minha cara de preocupação eterna, do mau humor, do cansaço, ele nunca deixou de me apoiar, em todos os sentidos. Querido, dedico esse trabalho a você, pois sem o amor e a segurança da nossa união e da nossa família, eu não teria forças pra me entregar com tanta intensidade a um objetivo intelectual como este. Amo você muito, sempre.

Meus queridos pais Admar e Tarcília eu agradeço cada segundo de tempo que passei ao lado de vocês. Vocês sempre me proporcionaram uma vida maravilhosa, com amor e incentivos, acreditando, apostando e investindo em meu potencial, não se contentando com o mínimo, mas sim com o máximo que poderia atingir. As idas aos museus, às festas, ao clube, ao cinema, aos concertos, às livrarias, sem contar as viagens, as brincadeiras, o respeito e o carinho por todos os meus amigos, meu jeito maluco de ser, meu comportamento algumas vezes inadequado, meus erros, meus acertos, minhas conquistas, fizeram com que eu me tornasse uma pessoa autntica e cheia de responsabilidade e criatividade. Eu e agora incluo minha irmã

Ana, não podíamos ter tido melhores mentores! Além disso, o apoio logístico nos últimos anos foi essencial para eu poder ter tempo e calma para encarar o desafio do doutorado. Amo vocês e muito obrigada!

Às minhas filhas, Malika e Jamile, eu agradeço por terem tornado a minha vida realmente valer a pena. A felicidade de ver vocês duas crescendo, tanto física como intelectualmente, é imensurável. Cada dia uma surpresa, uma descoberta, um beijo, um carinho, um chamego, isso tudo é muito bom! Amo vocês mais que tudo!

Minha querída, amada, companheira, amiga, irmã Ana Lúcia, agradeço o imenso apoio, em absolutamente todas as ocasiões: péssimas, boas, ótimas, terríveis. Você foi a que mais acreditou que tudo isso seria possível e foi! Obrigada por me fazer chorar de rir, mesmo quando tudo estava desmoronando! Amo você.

AGRADECIMENTOS

Para a realização desse trabalho, eu felizmente estive cercada de várias pessoas que contribuíram de maneira efetiva para sua finalização. Esta é, sem dúvida, a oportunidade de elogiar e agradecer àqueles que estão sempre ao nosso lado, colaborando de maneira especial em nossas vidas.

Agradeço à minha querida orientadora e amiga, Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato, por todo o incentivo e paciência, sempre me transmitindo calma, segurança, bom humor e muito carinho.

Agradeço ao meu novo amigo Paulo Henrique Rodrigues, que trabalhou junto comigo em todas as etapas mais críticas, transmitindo o seu imenso conhecimento de maneira clara e objetiva, incentivando-me a superar minhas piores dificuldades.

Aos doutores da Universidade de Rochester Profa. Jacqueline Abranches e Prof. José Lemos, eu agradeço a oportunidade de ter conhecido seu laboratório e toda a grande ajuda despendida durante o estudo. Além disso, todo o carinho e amizade recebidos em Rochester fizeram de minha estada muito especial.

À Prof. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer agradeço a colaboração realizada com seu laboratório.

À Profa. Dra. Silvana Cai agradeço a amizade, incentivos e considerações feitas no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Adriana Bona Mattos e à Cynthia Soares de Azevedo, agradeço imensamente a ajuda nos ensaios de indução à cárie. Sem vocês e o Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas, essa etapa do trabalho não teria se realizado e perderíamos a oportunidade de trabalhar num campo científico tão elucidativo e moderno.

Às minhas queridíssimas amigas de laboratório, Dani, Grazi e Andréa, agradeço a amizade, as conversas, as risadas, a troca de ideias e a ajuda braçal e mental do dia a dia. Foi ótimo ter vocês como minhas companheiras de bancada e de vida! Sentirei saudades da nossa

convivência diária sempre embalada por um bom café, docinhos e muita alegria.

À minha estagiária técnica Janaína, agradeço a imensa ajuda indispensável, principalmente na parte final do estudo, o capricho e a calma demandados no trabalho com amostras moleculares, fazendo com que tudo desse certo.

Aos estagiários Melissa, Juliana e Vitor agradeço por tornarem nossa vida muito mais fácil, sempre fazendo tudo que pedimos com muita boa vontade!

Aos novos amigos do laboratório da Profa. Dra. Marcia Alves Pinto Mayer, Sílvia, Maíke, Didi, Priscila, Ellen, Pamela, Ericka e Lucas agradeço toda a ajuda, gentileza e educação em todos os momentos que precisei de cada um de vocês.

Aos funcionários, Léo Batista Cruz e João Paulo Ribeiro agradeço por propiciarem todas as melhores condições de trabalho e à nossa nova secretária do departamento, Elizabete dos Santos Ribeiro, por toda a ajuda nos processos burocráticos da entrega da Tese.

Agradeço à FAPESP (Fapesp 09/05322-0) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) o suporte financeiro deste trabalho.

**“Research is to see what everybody else has seen and
to think what nobody else has thought”**

Albert Szent-Györgi

RESUMO

Siriani LK. Influência do gene *cnm* de *Streptococcus mutans* na formação de biofilme e na interação do microrganismo às células endoteliais. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Streptococcus mutans é considerado agente etiológico primário da cárie dentária e importante agente etiológico da endocardite infecciosa. O microrganismo pode ser classificado em quatro sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*), sendo o sorotipo *c* o mais prevalente na população. *S. mutans* também pode acessar a corrente sanguínea e colonizar células endoteliais das artérias coronárias, através de sua ligação e posterior invasão. A recente descoberta do gene *cnm* codificador de uma proteína de ligação ao colágeno, encontrado em algumas cepas de *S. mutans*, impulsionou as pesquisas da espécie nas áreas de formação de biofilmes e invasão celular. Os objetivos do presente estudo foram os de investigar o papel do gene *cnm* nas capacidades de *S. mutans* na: (1) formação de biofilmes em superfícies tratadas com colágeno e a expressão dos genes *spaP* e *brpA*, importantes para a formação de biofilme, (2) aderência (30 min e 2 h), invasão (5 h) e persistência (24 h) em células endoteliais e (3) desmineralização da dentina. Tanto os experimentos de formação de biofilme dependente de colágeno quanto os de aderência, invasão e persistência em células primárias Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC) foram realizadas utilizando cepas de *S. mutans* UA159 (sorotipo *c*), B14 (sorotipo *e*), OM50E (sorotipo *e*), LM7 (sorotipo *e*), OMZ175 (sorotipo *f*), NCTC 11060 (sorotipo *f*) e os isolados clínicos deste estudo 7.1 (sorotipo *c*), C2A4 (sorotipo *e*) e 61 (sorotipo *k*). Mutantes deletérios do gene *cnm* foram construídos em todas as cepas *cnm* positivas, exceto para C2A4. Cepas OMZ175 e 61 e seus respectivos mutantes também foram empregados para avaliar a expressão dos genes *spaP* e *brpA* por PCR em Tempo Real e a desmineralização da dentina através de Tomografia por Coerência Óptica (OCT). Foram isolados 144 cepas de *S.*

mutans coletadas de 47 pacientes. Dos isolados clínicos, 138 de 144 foram identificados como sorotipo *c*, 1/144 foi identificado como sorotipo *e* e 5/144 foram identificados como sorotipo *k*, porém não foi encontrado nenhum do sorotipo *f*. Os dados mostraram que o gene *cnm* foi significativo para a formação de biofilme em superfícies tratadas com colágeno e invasão de células endoteliais, mas não apresentou influência na adesão celular. Além disso, a maior parte das cepas *cnm* positivas foram capazes de persistir até 24 h intracelularmente. A variabilidade no nível de mRNA dos genes *spaP* e *brpA* foi observada, não sendo possível estabelecer uma correlação entre presença do gene *cnm*, a expressão de *spaP* e *brpA* e a formação de biofilme dependente de colágeno. Do mesmo modo, o modelo de cárie experimental não foi capaz de demonstrar a importância do gene *cnm* na desmineralização da dentina. Assim, o gene *cnm* foi importante para o desenvolvimento de biofilme de *S. mutans* dependente de colágeno e invasão do microrganismo à células endoteliais, mas não para a adesão às HCAEC.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Biofilmes. Colágeno. Células endoteliais. Internalização. Cárie dental.

ABSTRACT

Siriani LK. Influence of *cnm* gene of *Streptococcus mutans* in biofilm formation and interaction to endothelial cells. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Streptococcus mutans is considered a primary etiological agent of dental caries and an important etiological agent of infectious endocarditis. It can be classified into four serotypes (*c*, *e*, *f* and *k*), which serotype *c* is the most prevalent in the population. *S. mutans* may also have access to the bloodstream, which they may infect the endothelial cells of the coronary arteries by binding to and subsequently invading them. The recent breakthrough of *cnm* gene, which encodes a collagen binding protein found in some *S. mutans* strains, has set off new studies on this species, such as biofilm formation and bacteria-cell interactions. This study aims investigating the role of the *cnm* gene in the abilities of *S. mutans*: (1) biofilm formation on collagen-treated surfaces and the expression of biofilm formation key genes *spaP* and *brpA*; (2) adhesion (30 min and 2 h), invasion (5 h) and persistence (24 h) in endothelial cells and (3) dentin demineralization. Experiments on collagen-dependent biofilm formation, and adhesion, invasion and persistence in primary Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC) were performed using *S. mutans* strains UA159 (serotype *c*), B14 (serotype *e*), OM50E (serotype *e*), LM7 (serotype *e*), OMZ175 (serotype *f*), NCTC 11060 (serotype *f*) and the clinical isolates of this study 7.1 (serotype *c*), C2A4 (serotype *e*) and 61 (serotype *k*). Mutants *cnm*⁻ were constructed in all strains presenting the gene, except for C2A4. Strains OMZ175 and 61 and their respective mutants were also employed to evaluate both the expression of *spaP* and *brpA* genes by PCR Real Time and the dentin demineralization through Optical Coherence Tomography (OCT). One hundred forty four clinical isolates of *S. mutans* were collected from 47 patients. Of the clinical isolates, 138 out of 144 were identified as serotype *c*, 1/144 was identified

as serotype *e* and 5/144 were identified as serotype *k*, and no serotype *f* was found. Our data have shown that the *cnm* gene is significant for both biofilm formation on collagen-treated surfaces and invasion of endothelial cells, but it has no influence in cell adhesion. In addition, most of the *cnm* positive strains were able to persist up to 24 h intracellularly. Although some variability in the level of *spaP* and *brpA* mRNA was observed among the strains and their respective *cnm* mutants, it was not possible to establish a correlation between *cnm*, *spaP* and *brpA* expression, and collagen-dependent biofilm formation. Likewise, the model of experimental caries was not able to demonstrate the importance of *cnm* in dentin demineralization. Thus, gene *cnm* is required for *S. mutans* on collagen-dependent biofilm formation and invasion of endothelial cells, but it was not required for adhesion to HCAEC.

Keywords: *Streptococcus mutans*. Biofilms. Collagen. Endothelial cells. Internalization. Dental caries.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	32
2.2 Objetivos gerais.....	32
2.1 Objetivos específicos.....	32
3 METODOLOGIA.....	33
3.1 Caracterização das cepas de <i>Streptococcus mutans</i>.....	33
3.1.1 Coleta do material clínico e isolamento de <i>S. mutans</i>	33
3.1.2 Identificação de <i>S. mutans</i>	33
3.1.3 Determinação dos sorotipos de <i>S. mutans</i>	34
3.1.4 Detecção do gene <i>cnm</i> nos isolados clínicos de <i>S. mutans</i> ..	35
3.2 Construção de mutante knockout <i>cnm</i> no isolado clínico 61.....	36
3.3 Cepas bacterianas utilizadas no estudo.....	37
3.4 Influência do gene <i>cnm</i> na formação de biofilmes por <i>S. mutans</i> na presença de colágeno.....	38
3.5 Verificação da expressão dos genes <i>spaP</i> e <i>brpA</i> em biofilmes de <i>S. mutans</i> na presença de colágeno.....	40
3.5.1 Isolamento e purificação das amostras de RNA.....	40
3.5.2 Transcrição reversa.....	41
3.5.3 Avaliação da expressão de <i>spaP</i> e <i>brpA</i> por PCR em Tempo Real.....	42
3.6 Influência do gene <i>cnm</i> na interação de <i>S. mutans</i> com células endoteliais.....	43
3.7 Avaliação da desmineralização da dentina pela técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).....	45
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Identificação e classificação em sorotipos dos isolados clínicos de <i>S. mutans</i>.....	48

4.2 Influência do gene <i>cnm</i> na formação de biofilmes por <i>S. mutans</i> na presença de colágeno.....	49
4.3 Verificação da expressão dos genes <i>spaP</i> e <i>brpA</i> em biofilmes de <i>S. mutans</i> na presença de colágeno.....	53
4.4 Influência do gene <i>cnm</i> na interação de <i>S. mutans</i> com células endoteliais.....	55
4.5 Avaliação da desmineralização da dentina pela técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).....	62
5 DISCUSSÃO.....	64
5.1 Identificação e classificação em sorotipos dos isolados clínicos de <i>S. mutans</i>.....	64
5.2 Influência do gene <i>cnm</i> na formação de biofilmes por <i>S. mutans</i> na presença de colágeno.....	66
5.3 Verificação da expressão dos genes <i>spaP</i> e <i>brpA</i> em biofilmes de <i>S. mutans</i> na presença de colágeno.....	70
5.4 Influência do gene <i>cnm</i> na interação de <i>S. mutans</i> com células endoteliais.....	72
5.5 Avaliação da desmineralização da dentina pela técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).....	75
6 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	86
APÊNDICE B – Caracterização dos isolados clínicos de <i>Streptococcus mutans</i>: identificação, tipagem e presença do gene <i>cnm</i>.....	88
APÊNDICE C – Avaliação de <i>S. mutans</i> na interação celular utilizando o inóculo em fase estacionária.....	89

1 INTRODUÇÃO

A colonização dos dentes por bactérias orais resulta na formação da placa dental, biofilme formado por múltiplas espécies, normalmente em equilíbrio com o hospedeiro. Entretanto, modificações ambientais podem mudar a composição e as atividades metabólicas dos biofilmes orais, permitindo um aumento nas proporções de espécies que podem levar ao desenvolvimento de doenças como cárie e doenças periodontais (Jenkinson, Lamont, 2005).

Biofilmes são definidos como agregados bacterianos acumulados numa interface, incluídos em uma matriz de polissacarídeos. Tanto a matriz quanto os microrganismos podem ser variáveis, sendo a composição final definida pelas condições ambientais locais e pelo tempo de desenvolvimento (Fleming, Wingender, 2010). Claramente a estrutura polissacarídica da matriz influencia as propriedades química e física da placa bacteriana, tornando-a mais ou menos virulenta, promovendo adesão e coadesão de microrganismos, atuando como reservatório de energia, protegendo os microrganismos da influência de antimicrobianos, afetando a difusão de substâncias que perfluem o biofilme e ajudando a concentrar íons ou outros nutrientes fisiológicos no microambiente. Especificamente no biofilme dental, evidências mostram que a matriz extracelular é composta principalmente por produtos derivados da interação das enzimas glicosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferase (Ftf) com sacarose e amido hidrolisado (Bowen, Koo, 2011; Klein et al., 2009; Koo et al., 2010).

O início da colonização dental e a posterior construção do biofilme dependem da formação da película adquirida que recobre a superfície do esmalte. Os constituintes da película adsorvidos seletivamente são derivados da saliva e incluem, entre outros, proteínas ricas em prolina, amilase, lisozima, histatinas, peroxidase, estaterina e mucina tipo 2 (Siqueira et al., 2007). A maioria desses constituintes sofre alguma mudança conformacional quando em contato com a superfície dental,

gerando sítios específicos para a ligação bacteriana. A presença de algumas proteínas bacterianas na película foi relatada pela primeira vez por Armstrong (1967) e comprovada por Rölla (1983) e Schein (1987) através de técnicas imunológicas. Os autores identificaram Ftf, Gtfs e ácido lipoteicóico na película formada pela saliva total *in vitro* e *in vivo*. As Gtfs detectadas por Schilling e Bowen (1988) mostraram-se ativas e capazes de sintetizar glucano *in situ* a partir da sacarose, promovendo um excelente sítio de adesão para *Streptococcus mutans*.

Após a formação da película adquirida, a adesão bacteriana torna-se o principal e crucial passo para a formação do biofilme dental. As estruturas bacterianas que as tornam capazes de se ligar às proteínas da película são chamadas de adesinas. Estes constituintes naturais bacterianos reconhecem e ligam-se especificamente às mais diversas estruturas moleculares presentes nas superfícies-alvo, variando desde componentes teciduais, até materiais abióticos como vidro ou plástico recobertos por substratos (Klemm et al., 2010).

As primeiras bactérias a reconhecerem os sítios de adesão em qualquer *habitat*, são chamadas de pioneiras. Em comunidades recém-formadas sobre o esmalte recoberto por saliva, mais de 60% das espécies encontradas são estreptococos. Sua capacidade em expressar múltiplas adesinas lhes confere vantagem seletiva sobre outras espécies que apresentem menor versatilidade no reconhecimento primário de receptores (Jenkinson, Lamont, 2005). Além disso, essa propriedade é essencial para a colonização da cavidade oral, onde o fluxo contínuo da saliva, juntamente com movimentos dos lábios, língua e bochechas atua como deslocador e removedor bacterianos (Jenkinson, Lamont, 2006).

Uma vez estabelecidos nas superfícies dentais, os colonizadores pioneiros podem tornar-se residentes com o passar do tempo. Através da divisão celular formam microcolônias embebidas em material extracelular como polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis (Marsh, Martin, 2010). Estes microrganismos, juntamente com seus produtos, fornecem novas superfícies e substratos para os colonizadores secundários, que se

estabelecem por mecanismos de coadesão (Jenkinson, Lamont, 2006). A partir desta etapa, o biofilme começa a se organizar e seu desenvolvimento e sua maturação ocorrem por acúmulo de microrganismos adicionais provenientes da fase planctônica ou por divisão celular. Ajustes específicos na transcrição genética e na expressão de algumas proteínas representam uma importante resposta para o aumento de indivíduos no desenvolvimento do biofilme. Dessa forma, tanto a natureza do ambiente em que está inserido como a identidade de um microrganismo vizinho são fatores que influenciarão a competitividade pela sobrevivência e permanência no biofilme. Como a adesão, crescimento, remoção e recolonização das bactérias dentro do biofilme representam um processo contínuo, a placa dental está sempre se reorganizando e mudanças ambientais são importantes fatores modificadores dessas condições, podendo favorecer microrganismos melhor adaptados (March, Martin, 2010).

À medida que o tempo passa, a placa dental vai se tornando madura, adquirindo características estruturais mais complexas. O biofilme dental maduro é um ambiente altamente seletivo que apresenta drásticas flutuações de nutrientes disponíveis, pH, tensão de oxigênio e osmolaridade (Peterson et al., 2011). O catabolismo de açúcares provenientes da dieta cria um ambiente de estresse, como redução de pH e subprodutos de moléculas de oxigênio reativo, que são agentes danificadores de DNA, proteínas e outras macromoléculas celulares. Sendo assim, a tolerância e resposta de uma espécie bacteriana ao estresse estão intimamente ligadas a sua virulência (Lemos, Burne, 2008).

S. mutans é considerado o agente etiológico primário da cárie dental e possui atributos de virulência que permitem sua sobrevivência e sua seleção justamente nas situações ambientais críticas para a maioria das outras espécies. A capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies duras, metabolizar uma ampla variedade de carboidratos e sobreviver em ambientes de baixo pH constituem fatores chave de virulência desta bactéria não só na colonização da superfície dental como

na etiologia da cárie dental (Banas, Vickerman, 2003; Koo et al., 2010; Koo, Bowen, 2011; Lemos et al., 2005). Para sobreviver e multiplicar-se em um ambiente como a placa dental, *S. mutans* apresenta vários mecanismos de tolerância ao estresse como a manutenção da homeostase e vias metabólicas ativas em baixo pH, promovendo proteção, reparo e controle qualitativo de suas macromoléculas. Além disso, a alteração de vias catabólicas e os sistemas de sinalização transducional permitem uma regulação nutricional em condições de estresse (Lemos, Burne, 2008).

A proteína de membrana F-ATPase é considerada o principal determinante da tolerância ácida de *S. mutans*, pois permite que o microrganismo consiga manter o pH do citoplasma mais alcalino que o meio externo (Lemos et al., 2005). Através da extrusão de prótons e geração de ATP, a F-ATPase permite a manutenção da homeostase celular e a produção de energia para continuar o metabolismo de *S. mutans* em condições extremas (Sheng, Marquis, 2006).

Uma das consequências da contínua exposição ao estresse ambiental é o acúmulo de proteínas anormais, devido ao aumento de erros na transcrição e tradução (Lemos, Burne, 2008). Chaperonas e proteases modulam a estabilidade e previnem o acúmulo de proteínas malformadas, mantendo a homeostase proteica dentro da célula. Esse mecanismo foi descrito por Len et al. (2004) que, através da análise proteômica de culturas de *S. mutans* em pH 7 e 5, identificaram várias chaperonas moleculares, proteases e enzimas reparadoras de DNA.

O desenvolvimento de *S. mutans* no biofilme dental, onde existe uma considerável flutuação de nutrientes, também conta com um sistema de ajuste tanto na expressão gênica quanto metabólico, a fim de maximizar o uso de substâncias disponíveis (Lemos et al., 2005; Lemos, Burne, 2008). Apesar da necessidade de suportar períodos de limitação nutricional, a exposição abrupta ao excesso de carboidrato proveniente da dieta, pode resultar em um rápido acúmulo de intermediários tóxicos da via glicolítica, acidificando o meio ambiente e produzindo um estresse osmótico. Para sobreviver à falta de nutrientes, lidar com os efeitos dos

intermediários metabólicos da glicose e manter o balanço de NAD/NADH⁺, *S. mutans* conta com uma sofisticada rede regulatória, cujos principais mecanismos de regulação de carboidratos estão ligados ao sistema de transporte de açúcar fosfotransferase (PTS) (Abranches et al., 2006, 2008) e ao ppGpp (Lemos et al., 2007). Durante o período de falta de nutrientes ou em outras condições que impedem o crescimento células, as bactérias acumulam guanosina 3' - difosfato, 5' -trifosfato e guanosina 3' , 5' bispirofosfato p (ppGpp). O aumento da concentração de ppGpp resulta numa maior indução de genes codificadores para a degradação de proteínas e biossíntese de aminoácidos (Lemos et al., 2007).

A manutenção do biofilme formado por *S. mutans* depende também da capacidade do microrganismo de se adaptar às constantes mudanças ambientais. Sistemas regulatórios como o sistema de dois componentes (TCS), integram vários sinais físicos e químicos para coordenar padrões de expressão gênica, desempenhando um papel central na tolerância ao estresse, conferindo a *S. mutans* uma capacidade de adaptação às constantes mudanças (Lemos, Burne, 2008).

Para ser um colonizador de sucesso na superfície dental, *S. mutans* produz várias moléculas de superfície responsáveis pela adesão e pela colonização da superfície dental através de mecanismos dependentes e independentes da ingestão de sacarose pelo hospedeiro. A proteína SpaP também chamada de P1 (Lee et al., 1989), PA (Okahashi et al., 1989) ou antígeno I/II (Russell, Lehner, 1978), é uma proteína de superfície com 185 kDa que desempenha um papel importante na adesão sacarose-independente, mediando a ligação de estreptococos orais à película adquirida (Jakubovics et al., 2005; Jenkinson, Demuth, 1997; Pecharki et al., 2005). Mutantes de *S. mutans* deficientes de P1 mostraram-se menos cariogênicos em ratos gnotobiotas, sugerindo um papel de P1 na virulência desta bactéria (Crowley et al., 1999).

Na presença de sacarose, a produção de glucanos e a presença de adesinas capacitam *S. mutans* a aderir fortemente e formar biofilmes tri-dimensionais sobre superfícies (Lemos et al., 2005). Glucanos são

exopolímeros de glicose α -ligados e sintetizados por enzimas glicosiltransferases (Gtfs) a partir de sacarose que, em combinação com as proteínas ligadoras de glucano (Gbps), promovem a aderência e acúmulo de estreptococos cariogênicos na superfície dental. *S. mutans* expressa três glicosiltransferases (Gtfs B, C e D) que produzem glucanos solúveis e insolúveis. As Gtfs, de cerca de 150 kDa, partilham domínios estruturais e funcionais conservados e possuem mais de 50% de identidade de sequências de amino ácidos entre elas (Bowen, Koo, 2011).

Além da colonização no biofilme dental e seu papel primário na cárie dental, *S. mutans* pode ganhar acesso à corrente circulatória, causando bacteremia transiente seguida pela adesão a células endoteliais, que pode levar ao desenvolvimento de endocardite infectiva (Kilian, 1982; Moreillon, Que, 2004; Nakano et al., 2006; Nemoto et al., 2008; Nomura et al., 2006). A disseminação de bactérias orais pela corrente circulatória é muito comum em pacientes submetidos a procedimentos dentais como exodontias, tratamento endodôntico e cirurgia periodontal (Li et al., 2000). Após um procedimento na cavidade oral, foi demonstrado que bactérias podem alcançar coração, pulmões e sistema periférico capilar em menos que um minuto (Kilian, 1982). A endocardite infectiva é uma doença sistêmica grave e frequentemente fatal, sendo cada vez mais associada com doenças dentais e seu tratamento (Drangsholt, 1998; Li et al., 2000). A patogenia da endocardite infectiva é caracterizada pela formação de vegetações do endocárdio resultantes de um processo inflamatório. Essas vegetações consistem de um trombo de fibrina, contendo plaquetas e células inflamatórias, nas quais os microrganismos estão imersos (Shun et al., 2005).

Além disso, existe ainda uma associação significativa entre infecções dentais e o desenvolvimento da arteriosclerose coronária avançada, sendo a ligação de bactérias a uma matriz extracelular o primeiro fenômeno para a invasão bacteriana às células do hospedeiro (Epstein et al., 2009; Meurman et al., 2004). A matriz extracelular é uma estrutura macromolecular que se torna exposta quando a integridade do

tecido é afetada por traumas ou lesões. Proteínas como fibronectina, colágeno, laminina e elastina são os componentes mais comuns encontrados na matriz (Westerlund, Korhonen, 1993).

Patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, além de outros habitantes da placa dental, como estreptococos viridantes, têm sido associados com a endocardite infectiva e o desenvolvimento de placas arterioscleróticas/ateromatosas (Epstein et al., 2009; Meurman et al., 2004; Van der Meer et al., 1991). Estreptococos e enterococos são os microrganismos mais prevalentes em casos de endocardite infectiva (Delahane et al., 1995; Hoen et al., 2002; Wilson et al., 1995) e microrganismos como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mutans* são responsáveis por 17 a 41% dos casos (Delahane et al., 1995; Hoen et al., 2002; Goulet et al., 1986; Van Der Meer et al., 1991). Nakano et al. (2006) relataram que *S. mutans* é a espécie bacteriana mais prevalente nos tecidos lesados de valva cardíaca e em placas ateromatosas, com incidência de 68.6% e 74.1% dos pacientes, respectivamente. Quando compararam alguns isolados de *S. mutans* de placa dental e de valva cardíaca infectada de um único paciente, Nomura e colaboradores demonstraram que os isolados orais eram distintos dos encontrados na valva cardíaca: os isolados da valva cardíaca não possuíam GTFs intactas, mostravam taxa de adesão sacarose-dependentes mais baixas e apresentavam menor suscetibilidade à eritromicina e kanamicina (Nomura et al., 2006).

Algumas proteínas de superfície de *S. mutans* são descritas como facilitadores para a bacteremia e posterior adesão em tecidos endoteliais. A proteína SpaP, o polissacarídeo ramnose-glicose sorotipo-específico (RGP) e a produção de glucanos têm sido sugeridos como importantes fatores na patogênese da endocardite infectiva por promoverem a aderência aos tecidos endoteliais, desencadeando a resposta inflamatória (Engels-Deutsch et al., 2003; Shun et al., 2005; Vernier-Georgenthum et al., 1998). Outra proteína de regulação de formação de biofilme, a BrpA

foi descrita como sendo associada à virulência do microrganismo no sangue (Nakano et al., 2005). Finalmente, estudos recentes demonstraram também a importância de uma proteína portadora de um sítio de ligação ao colágeno, a Cnm (Abranches et al., 2011; Nakano et al., 2010; Nomura et al., 2009).

Além da afinidade por componentes da película adquirida do esmalte, a proteína SpaP também apresenta afinidade por fibronectina e colágeno (Brady et al., 2010). Um mutante desta proteína demonstrou capacidade reduzida de ligação à fibronectina, ao colágeno tipo I e ao fibrinogênio, sugerindo que P1 medeia a ligação de *S. mutans* a essas matrizes extracelulares e componentes sanguíneos (Beg et al., 2002).

O RGP é composto de esqueletos de α -1,2 e α -1,3 ramnana com cadeias laterais de glicose ligadas a ramnoses alternadas. Já foi demonstrada a capacidade do RGP atuar como adesina, mediando a ligação de *S. mutans* a uma variedade de linhagens celulares e desencadeamento de resposta inflamatória (Chia et al., 2004; Engels-Deutsch et al., 2003). A ligação das cadeias laterais de glicose determina a sorotipo-especificidade, que permite a classificação de *S. mutans* em três sorotipos (*c/e/f*) enquanto o sorotipo *k* é determinado a partir de uma região específica encontrada no gene *rgpF* (Linzer et al., 1986; Nakano et al., 2004), pois este último sorotipo não apresenta cadeias laterais de glicose. A frequência de distribuição varia entre os sorotipos, assim como suas propriedades biológicas.

As Gtfs de *S. mutans* são proteínas altamente imunogênicas e ativam respostas inflamatórias em modelos experimentais de endocardite em ratos (Shun et al., 2005). Além disso, podem estimular a proliferação de células T e modular a produção de citocinas a partir de monócitos (Chia et al., 2001). O estudo publicado por Nomura et al. (2006) apresentou cepas classificadas no sorotipo *c*, isoladas de válvulas cardíacas. A análise através de Western Blot demonstrou que as cepas não apresentavam a expressão de GtfB ou GtfC. Esses isolados também apresentaram menor taxa de adesão sacarose-dependentes e diminuição da suscetibilidade à

eritromicina e kanamicina. Shun et al. (2005) infectaram ratos com mutantes deficientes das três GTFs e observaram que os animais apresentavam uma sobrevivência menor do que aqueles infectados com cepas selvagens, indicando que a mutação das enzimas GTFs pode ser um fator facilitador de bacteremia.

A característica de evasão à fagocitose é relatada como sendo de crucial importância na bacteremia e posterior colonização de tecidos. Além das proteínas descritas anteriormente, Nakano et al. (2005) correlacionaram a proteína de superfície BrpA, associada normalmente à formação de biofilme (Wen, Burne, 2001; Wen et al., 2005), à capacidade de disseminação na corrente circulatória. No estudo, os pesquisadores construíram mutantes do gene *brpA* em uma cepa sorotipo *c* e observaram que as células bacterianas tinham a susceptibilidade a fagocitose diminuída, quando comparadas com as selvagens. Nos ensaios de sobrevivência em corrente sanguínea, a cepa selvagem apresentou maior viabilidade em função do tempo do que a cepa mutante, sugerindo uma função importante para esta proteína em *S. mutans*.

Um estudo epidemiológico com crianças japonesas revelou que o sorotipo *c* é o mais frequentemente isolado (84.8%), seguido pelo sorotipo *e* (13.3%), enquanto que o sorotipo *f* é raramente encontrado (1.9%) (Shibata et al., 2003). Um novo sorotipo de *S. mutans* (sorotipo *k*), isolado da cavidade oral e da corrente circulatória de um paciente com endocardite infectiva foi descrito por Nakano et al. (2004). Cepas do sorotipo *k* foram caracterizadas por serem não reagentes a antissoro anti-*c*, anti-*e* e anti-*f* e por não apresentarem as cadeias laterais de glicose no RGP. Estes isolados foram menos susceptíveis à fagocitose, sugerindo que o sorotipo *k* pode persistir por tempo mais prolongado na corrente circulatória, aumentando suas chances de encontrar outro nicho favorável no hospedeiro. Uma cepa sorotipo *k* chamada de LJ23, isolada no Japão, teve o seu genoma sequenciado e recentemente publicado (Aikawa et al., 2012).

A proteína Cnm é frequentemente encontrada em sorotipos incomuns como sorotipo *f* e *k*, e raramente em sorotipo *c*. Um estudo epidemiológico realizado no Japão mostra que o gene *cnm* está presente em 10 a 20 % dos isolados de *S. mutans* (Nakano et al., 2010). Devido à capacidade da Cnm de se ligar ao colágeno foi proposto que essa proteína possua algum papel no desenvolvimento de lesões de cárie em dentina e na colonização da placa de ateroma (Nakano et al., 2010). Estudos realizados no Japão (Nakano et al., 2004; Nomura et al., 2006; Paterick et al., 2007) relatam a alta frequência de detecção de alguns dos sorotipos *f* e *k* em pacientes com aterosclerose e endocardite infectiva. Abranches et al. (2009) investigaram as propriedades invasivas de 14 cepas de *S. mutans* pertencentes aos sorotipos *c*, *e* e *f* e demonstraram que a cepa OMZ175 (sorotipo *f*) foi a que apresentou maior potencial de invadir células endoteliais. Abranches et al. (2011), utilizando cepas portadoras do gene *cnm* dos sorotipos *e* e *f*, assim como seus respectivos mutantes deficientes, conseguiram relacionar a proteína Cnm com a invasão à células endoteliais, comprovando a importância do gene *cnm* nesse tipo de infecção. Os autores, porém não encontraram relação entre a formação de biofilme dependente de colágeno com as cepas portadoras do *cnm*.

Apesar do estudo de Abranches et al. (2011) relacionarem diretamente a proteína Cnm e o processo de invasão endotelial, o papel de Cnm em cepas de *S. mutans* portadoras dessa proteína ainda não está totalmente elucidado. Provavelmente Cnm não é a única proteína presente em *S. mutans* que permite a ligação ao colágeno. Alguns estudos publicados recentemente relataram a invasão de *S. mutans* não portadores do gene *cnm* a outros tipos de células endoteliais. Nagata et al. (2011) realizaram ensaios de invasão em células endoteliais de aorta com estreptococos do grupo viridans. Os pesquisadores observaram que uma cepa de *S. mutans* sorotipo *c* apresentava alta taxa de invasão no período de 8 horas e uma boa persistência no período de 24 horas. A espécie bacteriana não promoveu mudanças morfológicas nas células endoteliais, porém foi a que mais induziu a produção de IL-6 e 8 no

período de 24 horas (Nagata et al., 2011). Nomura et al. em 2012 identificaram e caracterizaram uma nova proteína de superfície de ligação ao colágeno tipo I, chamada de Cbm, presente em cepas *cnm* negativas. Utilizando cepas de sorotipo *k cbm* positivas, e seus respectivos mutantes deletérios do gene *cbm*, os autores concluíram que a proteína promoveu maior adesão às células endoteliais. Nos ensaios de adesão ao colágeno tipo I a influência positiva desta proteína foi constatada, sendo caracterizada como dose dependente.

Considerando ainda que *S. mutans* é o principal microrganismo causador de cáries, a suscetibilidade da estrutura dental é fator determinante para a desmineralização e posterior cavitação. A dentina é caracterizada pela presença de canalículos dentinários, que facilitam a invasão bacteriana. É constituída por uma parte mineral composta por hidroxiapatita, recoberta principalmente por colágeno tipo I. Outros tipos de colágeno (III, V e VI), proteínas e proteoglicanos também estão presentes em menor quantidade, compondo a fração orgânica (Love, Jenkinson, 2004). Na superfície radicular, a estrutura e composição da matriz dentinária influenciam tanto a adesão quanto a invasão tubular microbiana e o papel de *S. mutans* no desenvolvimento de lesões radiculares é suportado pela sua capacidade de se ligar e degradar o colágeno tipo I presente nesta superfície (Han et al., 2006). No entanto, a possível influência de Cnm na cariogenicidade de cepas portadoras desta proteína ainda está para ser determinada, já que, Cnm parece não ser a única proteína capaz de permitir a ligação ao colágeno (Brady et al., 2010; Nomura et al., 2012).

Assim, ensaios para determinação de virulência são importantes para estabelecer o potencial cariogênico dos diferentes sorotipos, e o sistema de indução em cárie *in vitro* utilizando microrganismos é bastante empregado além de representar um excelente modelo experimental para esta finalidade (Fontana et al., 1996; Marquezan et al., 2009).

Com base nesses estudos é razoável concluir que *S. mutans* pode apresentar outras relevantes características além da cariogênica,

desenvolvendo possivelmente importante papel nas doenças infecciosas cardíacas. Além disso, a maioria dos estudos abordando o potencial patogênico de *S. mutans* para doenças cardiovasculares baseou seus resultados em estudos realizados em cepas padrão, que possuem propriedades biológicas bastante diferenciadas das apresentadas por isolados clínicos bucais. Para tanto, fatores de virulência como adesão e invasão de células endoteliais por diferentes sorotipos de amostras bucais de *S. mutans* devem ser pouco a pouco determinados, esclarecendo melhor suas relações com doenças sistêmicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais desse estudo visam esclarecer algumas funções importantes do gene *cnm* na virulência de *Streptococcus mutans*. Para isso, o estudo foi conduzindo empregando cepas de *S. mutans* de diferentes sorotipos e suas respectivas linhagens mutantes deficientes do gene *cnm*. Assim, a formação de biofilmes em superfície tratadas pelo colágeno, a expressão de genes relacionados com ligação ao colágeno e evasão às defesas do hospedeiro, a interação com células endoteliais, assim como o potencial cariogênico para a dentina serão investigados. Para isso, os objetivos específicos foram determinados.

2.2 Objetivos específicos

- Construção da linhagem mutante do isolado clínico 61 Δ *cnm* de *S. mutans* deficiente do gene *cnm* para esclarecer possíveis funções desse gene.
- Avaliação da influência do gene *cnm* na formação de biofilmes de *S. mutans* formados na presença de colágeno.
- Avaliação da influência do gene *cnm* na adesão, invasão e persistência de *S. mutans* a células endoteliais.
- Avaliação da expressão dos genes *spaP* e *brpA* em biofilmes de *S. mutans* OMZ175 e 61 e seus respectivos mutantes deficientes do gene *cnm*, desenvolvidos na presença de colágeno.
- Avaliação da influência do gene *cnm* das cepas de *S. mutans* OMZ175 e 61 e seus respectivos mutantes na desmineralização da dentina.

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização das cepas de *Streptococcus mutans*

3.1.1 Coleta do material clínico e isolamento de *S. mutans*

Os indivíduos selecionados como voluntários receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), e somente aqueles que aceitaram os termos colocados, foram incluídos na pesquisa. Participaram do estudo indivíduos saudáveis sem histórico de uso de antimicrobianos sistêmicos ou tópicos nos últimos 30 dias antes da coleta. As amostras foram isoladas de um *pool* da placa dental supra-gengival coletada com o auxílio de curetas, enquanto o material de dorso lingual foi coletado com o auxílio de raspadores. As amostras clínicas, tanto da placa como do dorso lingual, foram transportadas em VMGA III (Möller, 1966) e diluídas em PBS. Alíquotas de diluições seriadas foram semeadas em Ágar Mitis Salivarius (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA), acrescido de 15% de sacarose (Difco) e de 0.2 UI/ml de bacitracina (Sigma, Gillingham, Inglaterra) (MSB), seletivo para *S. mutans* (Gold et al., 1973). As placas foram incubadas a 37 °C em microaerofilia em câmara de CO₂ (ShellLab, Cornelios, OR, EUA) durante 48 h. Após o desenvolvimento das culturas e análise da morfologia colonial em microscópio estereoscópico (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, EUA), as colônias com características morfológicas compatíveis com as amostras de interesse foram re-isoladas para a obtenção de culturas puras, em seguida estocadas a -80 °C em solução de congelamento contendo 10% de glicerol para posterior identificação.

3.1.2 Identificação de *S. mutans*

A identificação de *S. mutans* foi realizada utilizando iniciadores espécie-específicos propostos por Chen et al. (2007) baseados na

sequência do gene 16S rRNA (Quadro 1). A extração de DNA das cepas bacterianas foi realizada utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), de acordo as instruções do fabricante. A amplificação do fragmento foi realizada com Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em volume final de 10 µl, nas seguintes condições: 3 min a 94 °C seguidos de 35 ciclos de 45 s a 94 °C para desnaturação, 60 s a 55 °C para anelamento e 90 s a 72 °C para extensão, finalizando com 10 min de extensão a 72 °C em termociclador C100 Thermo Cycler (Biorad, Hercules, CA, EUA). Os produtos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, visualizados sob luz UV após a coloração com GelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA) e documentados em DNR Bioimaging System Mini Bis Pro (DNR BioImaging Systems, Israel) através de um arquivo digital. A cepa *S. mutans* UA159 foi utilizada como controle positivo.

3.1.3 Determinação dos sorotipos de *S. mutans*

Os sorotipos *c*, *e*, *f* e *k* foram determinados por iniciadores específicos (Nakano et al., 2004; Shibata et al., 2003) e estão apresentados no Quadro 1. As amostras de DNA cromossomal foram amplificadas em uma mistura total de 10 µl, com a utilização da Taq DNA polimerase (Invitrogen) com iniciadores específicos para cada sorotipo. As seguintes condições termo cíclicas foram empregadas: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de 45 s a 94 °C para desnaturação, 60 s a 55 °C para anelamento e 90 s a 72 °C para extensão, finalizando com 10 min de extensão a 72 °C. Os produtos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, visualizados sob luz UV após a coloração com GelRed (Biotium) e documentados em DNR Bioimaging System Mini Bis Pro através de um arquivo digital.

Quadro 1 – Iniciadores para PCR usados nesse estudo

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Propósito	Referência
SM 479F SM 479R	TCGCGAAAAAGATAAACAAACA GCCCCTTCACAGTTGGTTAG	Identificação de <i>Streptococcus mutans</i>	Chen et al.(2007)
SC-F SC-R	CCGAGTGCTTTTTACAAGTGCTGG AACCACGGCCAGCAAACCCTTTAT	Determinação de sorotipo <i>c</i> de <i>Streptococcus mutans</i>	Shibata et al.(2003)
SE-F SE-R	CCTGCTTTTCAAGTACCTTTCGCC CTGCTTGCCAAGCCCTACTAGAAA	Determinação de sorotipo <i>e</i> de <i>Streptococcus mutans</i>	Shibata et al.(2003)
SF-F SF-R	CCCACAATTGGCTTCAAGAGGAGA TGCGAAACCATAAGCATAGCGAGG	Determinação de sorotipo <i>f</i> de <i>Streptococcus mutans</i>	Shibata et al.(2003)
CEFK-F K-R	ATTCCCGCCGTTGGACCATTCC CCAATGTGATTCATCCCATACC	Determinação de sorotipo <i>k</i> de <i>Streptococcus mutans</i>	Nakano et al.(2004)
Cnm – 1F Cnm – BF Cnm – 1R	GACAAAGAAATCAAAGATGT GACAATCCTGATCAAAAGAC GCAAAGACTCTTGTCCCTGC	Detecção do gene <i>cnm</i> em cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	Nomura et al.(2009)
cnm110-F cnm1560-R	CCGTTGCCATCATTTGC CAGGACCTTGTTTGGCT	Construção dos mutantes <i>cnm</i>	Abranches et al. (2011)
16SrRNAF 16SrRNAR	CTTACCAGGTCTTGACATCCCG ACCCAACATCTCACGACACGAG	Normalização da expressão de cada gene	Senadheera et al.(2007)
spaPF spaPR	GACTTTGGTAATGGTTATGCATCAA TTTGTATCAGCCGGATCAAGTG	Expressão do gene	Senadheera et al.(2007)
brpAF brpAR	TTATGATGCCAAGCTTAATGCAGCC CCAAGTGAACCAGCCCTTCCATATT	Expressão do gene	Senadheera et al. (2007)

3.1.4 Detecção do gene *cnm* nos isolados clínicos de *S. mutans*

Para a detecção do gene *cnm* nos isolados clínicos de *S. mutans* foram utilizados os iniciadores BF e 1R (Nomura et al., 2009), apresentados no Quadro 1. A amplificação e a documentação foram realizadas nas condições já descritas, gerando um amplicon de aproximadamente 800 pb. Nas amostras que apresentaram o gene, foram

realizadas novas amplificações para a detecção do gene inteiro, de aproximadamente 1800 pb, com os iniciadores 1F e 1R (Nomura et al., 2009), apresentados no Quadro 1. As condições de amplificação utilizadas para este segundo par de iniciadores foram semelhantes à primeira, porém com tempo de extensão de 2 min a cada ciclo. Os produtos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, visualizados sob luz UV após a coloração com GelRed (Biotium) e documentados em DNR Bioimaging System Mini Bis Pro através de um arquivo digital.

3.2 Construção de mutante knockout *cnm* no isolado clínico 61

A construção de linhagem mutante foi realizada segundo Abranches et al. (2011) pela técnica PCR Ligation Mutagenesis (Lau et al., 2002). A linhagem mutante OMZ175 Δ *cnm* foi construída e descrita por Abranches et al. (2011) e gentilmente cedida ao laboratório da Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato. A partir deste mutante, a linhagem 61 Δ *cnm* foi construída neste estudo.

A cepa *cnm* positiva 61 teve seu gene rompido pela inserção não polar do marcador de kanamicina, proveniente da cepa OMZ175 Δ *cnm*, 750 pb à jusante do codom de iniciação ATG. Para a sua construção, um produto de PCR foi gerado a partir do DNA do OMZ175 Δ *cnm* utilizando os iniciadores 110*cnm*F e 1560*cnm*R, e 100 ng desse produto purificado foi utilizado para transformar as células da cepa de *S. mutans* 61 competentes.

Para o procedimento de transformação, a cepa *S. mutans* 61 foi cultivada em Brain Heart Infusion (BHI, Difco) a 37 °C em câmara de CO₂ (ShellLab) por 16 h; a cultura foi diluída em BHI pré-aquecido enriquecido com 10% de soro de cavalo, a 1:20 e 1:40 e incubadas até atingirem a densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm, verificada em espectrofotômetro (DO₆₀₀=0,1; Biophotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Foi adicionado à cultura 5 μ l de uma solução de Competence

Stimulating Peptide (CSP, GenScript – 5 µg/ml) seguido por incubação por 15 min. A CSP é uma proteína proveniente de *S. mutans* e torna as células competentes para a transformação. Após esse período, 100 ng do produto purificado proveniente da cepa OMZ175Δ*cnm* foram adicionados à cultura da cepa 61, que foi incubada durante três horas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após esse período, 100 µl da suspensão bacteriana foram inoculados em ágar BHI contendo kanamicina (1 mg/ml). A presença do inserto de inativação foi confirmada por sequenciamento.

3.3 Cepas bacterianas utilizadas no estudo

As cepas bacterianas empregadas nesse estudo estão apresentadas no Quadro 2. Para os ensaios que constam dos objetivos do estudo, foram empregadas as cepas de *S. mutans* UA159 (sorotipo *c*), B14 (sorotipo *e*), OM50E (sorotipo *e*), LM7 (sorotipo *e*), OMZ175 (sorotipo *f*), NCTC 11060 (sorotipo *f*) e os isolados clínicos, 7.1 (sorotipo *c*), C2A4 (sorotipo *e*) e 61 (sorotipo *k*). As linhagens com mutação deletéria para o gene *cnm*, exceto para a cepa 61, foram construídas por Abranches et al. (2011) e gentilmente cedidas para este estudo. Para a avaliação da expressão dos genes *spaP* e *brpA* em biofilmes desenvolvidos na presença de colágeno e para a verificação da influência da presença do gene *cnm* na cariogenicidade foram empregadas as cepas OMZ175 e 61, assim como seus respectivos mutantes.

Quadro 2 – Cepas bacterianas utilizadas nesse estudo

<i>S. mutans</i>	Origem	Sorotipo	Presença do gene <i>cnm</i>	Fonte
UA159	Biofilme dental	<i>c</i>	negativa	University of Alabama
B14	Biofilme dental	<i>e</i>	positiva	A. Bleiweis
OM 50 E	Biofilme dental	<i>e</i>	positiva	P. Caufield
LM7	Biofilme dental	<i>e</i>	positiva	P. Caufield
OMZ 175	Biofilme dental	<i>f</i>	positiva	B. Guggenheim
NCTC11060	Corrente sanguínea	<i>f</i>	positiva	NCTC
7.1	Biofilme dental	<i>c</i>	negativa	Este estudo
C2A4	Biofilme dental	<i>e</i>	positiva	Este estudo
61	Biofilme dental	<i>k</i>	positiva	Este estudo
OMZ 175Δ <i>cnm</i>	<i>cnm</i> knockout	<i>f</i>	negativa	J. Abranches
NCTC11060Δ <i>cnm</i>	<i>cnm</i> knockout	<i>f</i>	negativa	J. Abranches
B14Δ <i>cnm</i>	<i>cnm</i> knockout	<i>e</i>	negativa	J. Abranches
OM50EΔ <i>cnm</i>	<i>cnm</i> knockout	<i>e</i>	negativa	J. Abranches
LM7Δ <i>cnm</i>	<i>cnm</i> knockout	<i>e</i>	negativa	J. Abranches
61Δ <i>cnm</i>	<i>cnm</i> knockout	<i>k</i>	negativa	Este estudo

3.4 Influência do gene *cnm* na formação de biofilme por *S. mutans* na presença de colágeno

A metodologia adotada para a quantificação dos biofilmes de *S. mutans* foi baseada em Waterhouse e Russel (2006), Nomura et al. (2009) e Standar et al. (2010) com algumas modificações. Os ensaios foram realizados na presença e ausência de colágeno para verificar a possível influência desta proteína na formação de biofilme das cepas de *S. mutans* estudadas.

Os biofilmes foram desenvolvidos em placas de microtitulação de 48 poços (Biofill, Allentown, PA, EUA) na superfície de lamínulas de vidro de 9 mm de diâmetro (Knittel, Bielefeld, Alemanha) tratadas com 200 µl

de uma solução de ácido acético glacial 0,25 M contendo ou não colágeno tipo I (Sigma) a 100 µg/ml a 4 °C por 16 h.

As cepas de *S. mutans* foram cultivadas em Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) a 37 °C por 24 h em câmara de CO₂. Foram então transferidas para o meio líquido Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) e cultivadas a 37 °C em câmara de CO₂ por 16 h. As culturas foram então diluídas a 1:10 em TSB, pré-aquecido e pré-reduzido na câmara de CO₂ e adequadas para a DO₆₀₀=0,3 verificada em espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf). Os tubos foram incubados em câmara de CO₂ durante aproximadamente 3 h.

Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 5.000xg durante 5 min e as células ressuspensas em Biofilm Medium (BM) (Loo et al., 2000) acrescido de 50 mM (1,7%) de sacarose (Difco) (Standar et al., 2010) como fonte de carboidratos e padronizadas na DO₆₀₀=0,8 (cerca de 1 x 10¹⁰ ufc/ml). Das suspensões padronizadas, alíquotas de 500 µl foram depositadas em cada poço, em quintuplicata. Os biofilmes foram desenvolvidos em câmara de CO₂ por até 24 h, com leituras intermediárias. Estes experimentos foram realizados com as cepas UA159, B14 e OMZ175 e tiveram como objetivo otimizar os ensaios para ampliar possíveis diferenças na influência do colágeno tipo I na formação de biofilmes. Também foi realizado um ensaio utilizando o meio TSB suplementado ou não com sacarose a 50 mM (1,7%). A partir desses resultados, os ensaios foram realizados com todas as cepas de *S. mutans* e suas respectivas linhagens mutantes.

Os biofilmes então foram desenvolvidos em 500 µl de BM com aproximadamente 1 x 10¹⁰ ufc/ml, suplementado com 50 mM de sacarose, conforme descrito anteriormente, durante 3 h em câmara de CO₂ a 37 °C. Após esse período, o meio foi substituído por TSB sem a suplementação da sacarose, por 21 h adicionais, nas mesmas condições ambientais.

Para a avaliação da biomassa, o meio de cultura foi removido e a coloração do biofilme foi realizada com 100 µl de safranina a 0,4%

durante 15 min a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes por imersão em água destilada. Em seguida, a descoloração do biofilme foi realizada com 200 µl de etanol a 95% por 15 min. Após esse período, três alíquotas de 50 µl da solução de etanol de cada poço foram transferidas para poços de placa de 96 poços e a absorbância a 490nm (A₄₉₀) foi verificada em leitor de placas (Microplate Reader Model 680, Biorad, Foster City, California, EUA). Desse modo, foram obtidas três leituras de cada poço, totalizando quinze leituras para cada experimento. Os experimentos foram repetidos três vezes. As diferenças na formação dos biofilmes entre as amostras foram determinadas pelo Teste *t* de Student e consideradas significantes quando o valor de *p* foi < 0,05.

3.5 Verificação da expressão dos genes *spaP* e *brpA* em biofilmes de *S. mutans* na presença de colágeno

3.5.1 Isolamento e purificação das amostras de RNA

A avaliação da influência do gene *cnm* na expressão dos genes *spaP* e *brpA* importantes na formação do biofilme e na possível interação com o colágeno, foi realizada na cepas de *S. mutans* OMZ175 (sorotipo *f*) e 61 (sorotipo *k*) e suas respectivas linhagens mutantes deficientes do gene *cnm*. Os biofilmes de *S. mutans* foram desenvolvidos em uma das superfícies de três frascos quadrados de vidro de 250 ml (Pyrex, Washington Tyne, Inglaterra). As superfícies dos frascos foram recobertas com 5 ml de solução de 0,25 M ácido acético glacial contendo ou não colágeno a 100 µg/ml a 4 °C durante 16 h. Após esse período, as soluções foram removidas e os frascos foram inoculados com 10 ml das culturas de *S. mutans* em BM, padronizados como descrito anteriormente. Os frascos foram incubados em câmara de CO₂ por 3 h. O meio de cultura foi então removido e substituído por 10 ml TSB e os frascos foram novamente incubados em câmara de CO₂ por 24 h.

Após esse período, 3 ml de TRIzol (Invitrogen) foram acrescentados a cada superfície e as amostras de biofilme coletadas com o auxílio de raspadores de células. As suspensões foram transferidas para tubos com tampa rosqueável de 2,0ml (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) contendo 0,7 ml de pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro) e congelados a -80 °C durante 16 h. As suspensões foram então agitadas em homogeneizador Mini-BeadBeater (BiospecProducts, Bartlesville, OK, EUA) a 4 °C por 6 séries de 20 s, com intervalo de 1 min em gelo. Cada suspensão homogeneizada foi transferida para tubos tipo Falcon (BD, Reserch Triangle Park, NC, EUA) de 50 ml e acrescida de 9,0 ml de TRIzol.

O isolamento do RNA seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante, sendo o RNA extraído com clorofórmio, precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e eluído em 200 µl de água livre de RNase. Ao final da extração as amostras de RNA foram tratadas por DNaseI (Invitrogen) em solução a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram purificadas em colunas RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EUA) com um segundo tratamento de DNaseI (Quiagen) na própria coluna, eluídas em 30 µl de água livre de RNase e armazenadas a -80 °C.

A concentração e qualidade do RNA em cada amostra foram verificadas e sua integridade investigada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1%. As amostras de RNA foram testadas através de amplificação com iniciadores para o gene 16S rRNA para o controle da ausência de DNA. Cada ensaio realizado em cada frasco originou uma amostra de RNA e, dessa forma, foram obtidas três amostras independentes de RNA de células de *S. mutans* em biofilme.

3.5.2 Transcrição reversa

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de RNA obtido em cada condição, usando iniciadores randômicos (Invitrogen, 3 mg/ml), e SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Invitrogen). A transcrição reversa foi desenvolvida a 42 °C por 16 h em termociclador

C1000 Thermal Cycler (BioRad) e o produto purificado pelo QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

3.5.3 Avaliação da expressão de *spaP* e *brpA* por PCR em Tempo Real

Os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados usando 2 µl de cDNA das amostras testadas, numa mistura contendo 1 µl de cada iniciador (10 mM), 10 µl de Quantimix (Biotools, Madri, Espanha), 2,4 ml de MgCl₂ (50 mM) e água até um volume final de 20 µl. Nas reações controle da amplificação, foi usada água em lugar de cDNA. Como controle positivo, foi empregada a amplificação de 10⁷ cópias do produto de amplificação do DNA genômico. A amplificação de cada amostra de cDNA foi realizada em triplicata.

A amplificação e a detecção foram realizadas em placas de 96 poços (BioRad) em um termociclador iCycler iQ (BioRad). Os parâmetros termo cíclicos foram 95 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 10 s (desnaturação), 60 °C por 45 s (anelamento e extensão).

Uma curva de dissociação foi obtida em todos os experimentos no produto de PCR obtido, pelo aumento sucessivo de 0.4 °C durante 10 segundos e a análise da pureza do produto foi feita comparando a temperatura de dissociação com o perfil obtido da amplificação de 10⁷ cópias do produto de amplificação do DNA genômico e com os controles negativos.

Após finalizada a reação, a aquisição dos dados e a subsequente análise foi feita usando o programa Biorad iQ5 Optical System. A análise dos dados foi simplificada através dos cálculos realizados em uma planilha do Excel (Microsoft), intitulada Análise dos Dados por PCR em Tempo Real (DART-PCR, Peirson et al., 2003). Essa planilha calculou os *Threshold Cycles*, amplificou a eficiência e demonstrou os valores R_0 (juntamente com os erros associados) dos valores brutos exportados do programa Biorad iQ5 Optical System. Diferenças na eficiência de amplificação foram avaliadas através da análise de variância (*one way ANOVA*), baseada na

hipótese nula: (1) a eficiência da amplificação é comparada dentro dos grupos estudados (detecção *outlier*); (2) a eficiência da amplificação é comparada entre os grupos estudados (amplificação equivalente). O nível dos transcritos do gene 16S rRNA foi utilizado para a normalização dos resultados da amplificação.

As diferenças na expressão de genes entre as amostras foram determinadas pelo Teste *t* de Student e consideradas significantes quando o valor *p* foi $< 0,05$ e a razão de expressão $> 1,5$ vezes.

3.6 Influência do gene *cnm* na interação de *S. mutans* com células endoteliais

Ensaio de proteção com antibióticos foram realizados segundo Abranches et al. (2011) para determinar a capacidade de invasão das cepas de *S. mutans* em células endoteliais da artéria coronária humana (Human Coronary Artery Endothelial Cells, HCAEC, Lonza, Allendale, NJ, EUA). Primeiramente as células foram cultivadas em meio celular basal (EBM-2, Lonza) suplementado com EGM-2MV (Lonza), como sugerido pelo fabricante. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ até atingir a monocamada, que então foi lavada com PBS pré-aquecido e submetida a tratamento com Accutase (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) por 11 minutos. Após esse período, as células foram recolhidas para um tubo Falcon (BD) de 50 ml e lavadas com 10 ml de EGM-2MV. A amostra foi centrifugada a 70xg por 5 minutos a 37 °C. O sedimento foi suspenso em 5 ml de meio celular EBM-2 complementado e a mensuração da concentração celular foi feita a partir de 10 µl da suspensão celular misturado a 10 µl de corante Trypan Blue Stain 0,4% (Invitrogen) em contador celular Countess (Automatic Cell Counter, Invitrogen). Alíquotas contendo 10⁵ células endoteliais foram depositadas em poços de placas de 24 poços (Biofill), preenchidos por 1,0 ml de meio celular EBM-2 suplementado pré-aquecido, seguido de incubação a 37 °C, 5% de CO₂ durante 16 h.

As cepas bacterianas foram retiradas do estoque e cultivadas em TSA como descrito anteriormente. No dia anterior ao experimento, unidades formadoras de colônias foram transferidas para o meio líquido Brain Heart Infusion (BHI, Difco) e as culturas foram desenvolvidas a 37 °C em câmara de CO₂ por 16 h. Para a realização das subculturas, alíquotas foram então transferidas para novo BHI pré-aquecido na proporção de aproximadamente 1:10 e adequadas até apresentarem DO₆₀₀=0,2. Os tubos foram incubados novamente em câmara de CO₂ durante aproximadamente 3 h ou até as culturas atingirem a densidade DO₆₀₀=0,9. Um ml de cada subcultura foi lavado três vezes em PBS (pH 7,2) e as células ressuspensas em meio EBM-2 suplementado porém sem gentamicina, até a obtenção de suspensões contendo 1x10⁷ ufc/ml de *S. mutans*.

De cada suspensão bacteriana, 1,0 ml foi inoculado em cada poço contendo as células endoteliais, em triplicata, por 30 min, 2 h, 5 h e 24 h. Assim, após os períodos de 30 min e 2 h, referentes ao processo de adesão, os poços foram lavados três vezes com PBS pré-aquecido e em seguida as células endoteliais foram lisadas com água destilada estéril e pré-aquecida por 20 min. Para a verificação da capacidade invasiva, o contato entre as células endoteliais e bacterianas foi mantido por cinco horas sendo que após duas horas, as células endoteliais foram lavadas três vezes com PBS pré-aquecido, seguido de três h de incubação em 1 ml de EBM-2 contendo 300 mg/ml de gentamicina e 5 mg/ml de penicilina G, para eliminar as bactérias não invadidas. Para testar a persistência e viabilidade das bactérias internalizadas, outra placa foi incubada por mais 22 horas após a inoculação bacteriana e substituição pelo meio contendo antibióticos. Após essa segunda incubação, as células foram igualmente lavadas três vezes com PBS pré-aquecido e em seguida lisadas conforme descrito. Alíquotas de diluições seriadas dos lisados celulares foram inoculadas em TSA e incubadas por 48 horas a 37 °C a 5% de CO₂.

Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os inóculos

realizados em dias diferentes não apresentaram diferença significativa (Test *t* de Student). Os resultados foram demonstrados tanto através da quantificação em unidades formadoras de colônias (ufc) por ml das células bacterianas aderidas ou internalizadas recuperadas das células endoteliais, como pela porcentagem de células bacterianas recuperadas dos experimentos em relação aos inóculos iniciais.

3.7 Avaliação da desmineralização da dentina pela técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A influência do gene *cnm* na desmineralização de dentina foi verificada nas cepas *S. mutans* OMZ175 (sorotipo *f*) e no isolado clínico 61 (sorotipo *k*) e seus respectivos mutantes, segundo procedimento descrito por Azevedo, 2012.

Resumidamente, foram obtidos fragmentos de dentina provenientes de molares inclusos que foram lixados na face oclusal para remoção do esmalte, expondo dentina e criando uma superfície plana. Cada disco de dentina foi novamente seccionado no sentido vestibulo-lingual obtendo-se dois fragmentos. Os espécimes, então, foram totalmente protegidos com verniz ácido resistente, exceto na metade da face oclusal, região em que foi produzida a lesão de cárie (Azevedo, 2012).

O preparo dos espécimes foi realizado no Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob a orientação da Profa. Dra. Adriana Bona Matos. Cada conjunto experimental foi composto por quatro fragmentos de dentina, de aproximadamente 4 mm² cada um e fixados à tampa de tubos Falcon (BD) de 50 ml, de tal forma que, durante o experimento, ficassem submersos no meio de cultura, numa altura similar, sem que ficassem em contato uns com os outros ou com a parede do recipiente.

Os tubos, preenchidos por 40 ml de água destilada, foram embalados em envelopes para autoclave e todo este conjunto foi

submetido à radiação Gama (dose de 25 Kgy), para a esterilização das amostras.

Após realizado o controle de esterilidade, os conjuntos foram transferidos para tubos contendo TSB enriquecido com 5% de sacarose, inoculados com 2 ml de cultura padronizada de cada cepa bacteriana. Os conjuntos foram transferidos a cada 24 horas durante sete dias para novos tubos, com o objetivo de renovar o meio de cultura. Finalizado o período do desafio cariogênico, os fragmentos foram removidos dos fios de aço e o biofilme aderido à superfície foi cuidadosamente removido com gaze. Os espécimes foram lavados com água deionizada e armazenados individualmente a temperatura de 4 °C até o início da análise. Para isso, o verniz ácido resistente presente na metade das superfícies dos espécimes foi removido com solução de acetona.

A avaliação da desmineralização foi realizada pelo Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas, do Centro de Laser e Aplicações do IPEN/USP, pela técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT), que utiliza o interferômetro Michelson promovendo uma imagem de secção transversal do espalhamento da luz nos tecidos.

O sistema de OCT utilizado (OCP930SR, Thorlabs) é composto por um *led* superluminescente operando em 930 nm, com resolução, no ar, lateral e longitudinal de 6,0 μm , capaz de apresentar até 8 imagens por segundo. O sistema dispõe de uma ponta em fibra óptica capaz de alcançar as amostras facilmente, sem a necessidade de contato entre a ponta e as amostras. A luz conduzida pela fibra óptica foi dividida em dois feixes, um enviado para o espelho de referência e o outro levado até a amostra, possibilitando a formação de 4 imagens por segundo, assim promoveu imagens em tempo real (2000 X 512 pixels; equivalente a largura X altura de 6000 X 1581 μm^2).

As imagens foram adquiridas na região central da janela de exposição, gerando imagens tanto da região exposta ao desafio cariogênico como da região de substrato hígido. As imagens obtidas pelo

desafio cariogênico através do OCT foram analisadas comparativamente, quanto à profundidade da desmineralização.

O programa utilizado para a mensuração da profundidade de desmineralização foi o Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA), capaz de quantificar a profundidade de desmineralização fornecendo valores em μm . Em cada imagem cinco mensurações na região desmineralizada foram realizadas, distanciadas 500 μm entre si. As médias de profundidade de desmineralização foram comparadas pelo Teste t de Student e as diferenças consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação e classificação em sorotipos dos isolados clínicos de *S. mutans*

Foram identificados e tipados 144 isolados clínicos de *S. mutans* pertencentes aos sorotipos *c*, *e* e *k* coletados de 47 pacientes. O APÊNDICE B apresenta a caracterização dos isolados clínicos do estudo. As amostras coletadas de adultos pertencem a indivíduos do sexo feminino e masculino com idades variando entre 25 e 60 anos. As amostras de mesmo número pertencem a um mesmo paciente; a numeração subsequente refere-se aos isolados do mesmo indivíduo, diferenciando as amostras linguais (L). Os isolados clínicos provenientes de crianças foram cedidos pela Profa. Márcia Mayer e foram coletados de crianças com histórico ou não de cáries.

Dos isolados clínicos, 138/144 foram identificados como sorotipo *c*, 1/144 pertencente ao sorotipo *e*, 5/144 pertencentes ao sorotipo *k* e nenhum do sorotipo *f*. A distribuição dos sorotipos identificados na população estudada está apresentada na Tabela 1.

A maioria dos isolados clínicos pertence ao sorotipo *c* e não são portadores do gene *cnm*. Além do sorotipo *c*, foram identificados um isolado clínico do sorotipo *e* (C2A4) e, pela primeira vez no continente americano, um isolado clínico de cavidade bucal pertencente ao sorotipo *k* (61), ambos portadores do gene *cnm*. Todos os isolados clínicos identificados como sorotipo *k* pertencem a um mesmo indivíduo e, conseqüentemente apenas uma cepa foi selecionada para o estudo.

Tabela 1 - Distribuição dos isolados clínicos de *Streptococcus mutans* em sorotipos

Pacientes	Sorotipo <i>c</i>	Sorotipo <i>e</i>	Sorotipo <i>f</i>	Sorotipo <i>k</i>
47	46(97,8%)	1*(2,12)	0	1*(2,12%)

*presença do gene *cnm*

4.2 Influência do gene *cnm* na formação de biofilmes por *S. mutans* na presença do colágeno

As Figuras 1 a 5 mostram a otimização feita para a padronização dos ensaios de formação de biofilme por *S. mutans* tratadas ou não com colágeno, em diferentes meios de cultura e tempo de desenvolvimento.

As Figuras 1 a 3 mostram a quantificação de biofilmes desenvolvidos em BM suplementado com 50 mM da sacarose em diferentes períodos de tempo pelas cepas de *S. mutans* UA159, B14 e OMZ175 durante 24 horas na presença e ausência do colágeno.

Figura 1 – Quantificação dos biofilmes desenvolvidos em Biofilm Media durante 24 h por *S. mutans* UA159

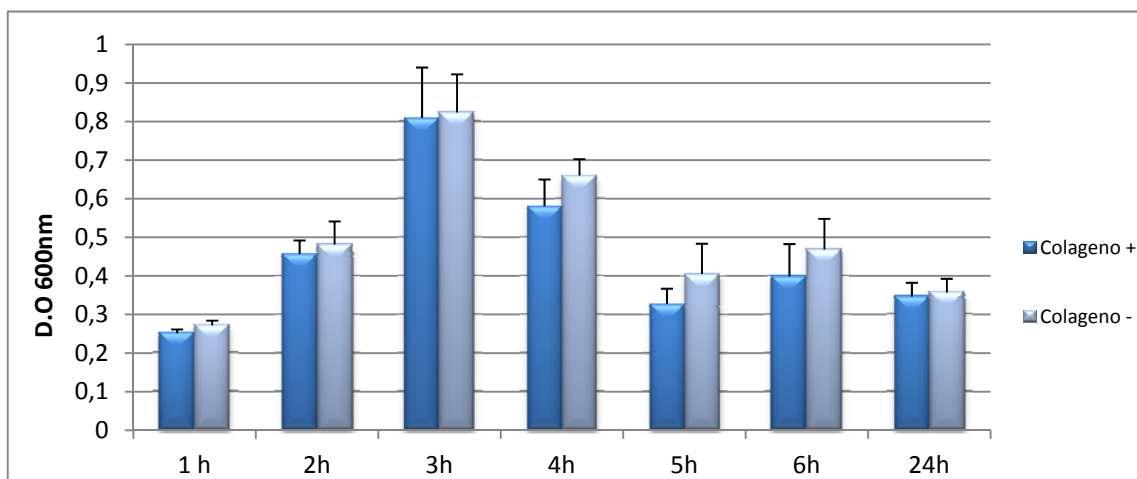


Figura 2– Quantificação dos biofilmes desenvolvidos em Biofilm Media durante 24 h por *S. mutans* OMZ175

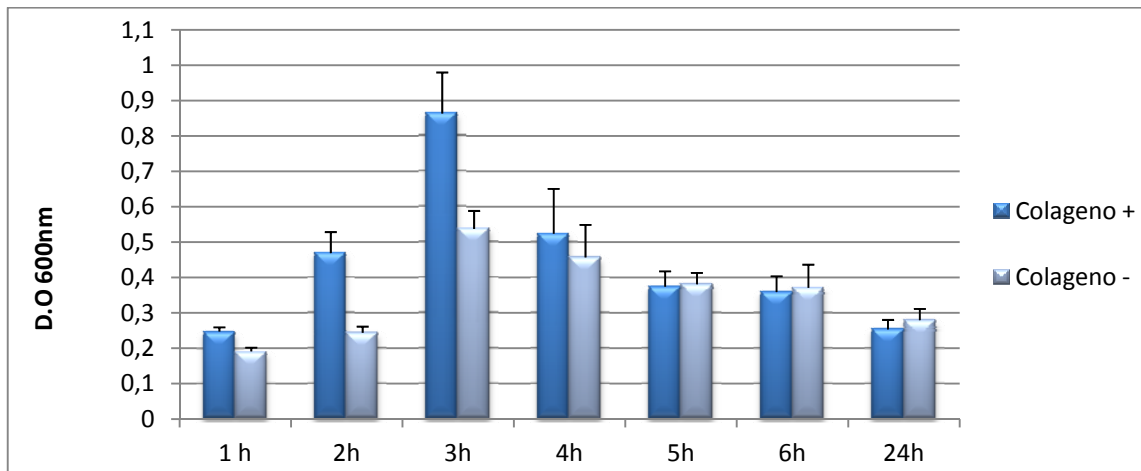
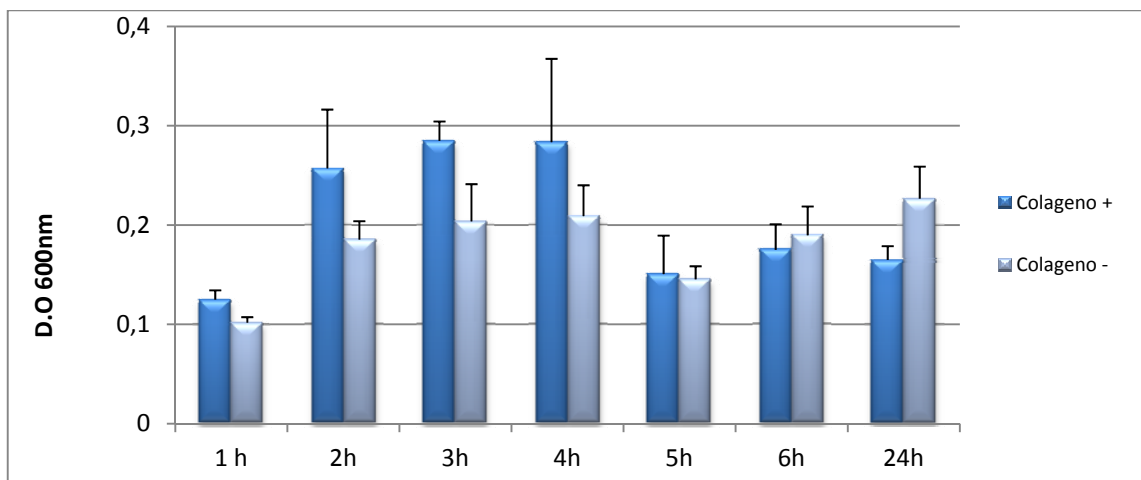


Figura 3 – Quantificação dos biofilmes desenvolvidos em Biofilm Media durante 24 h por *S. mutans* B14



As Figuras 4 e 5 apresentam os resultados da quantificação de biofilmes desenvolvidos em TSB com ou sem a suplementação de 50 mM da sacarose em durante 24 horas por *S. mutans* UA159 e B14 na presença e ausência do colágeno.

Figura 4 – Quantificação dos biofilmes desenvolvidos em TSB suplementado com sacarose 50 mM durante 24 h em superfícies tratadas ou não por colágeno por *S. mutans* UA159 e B14

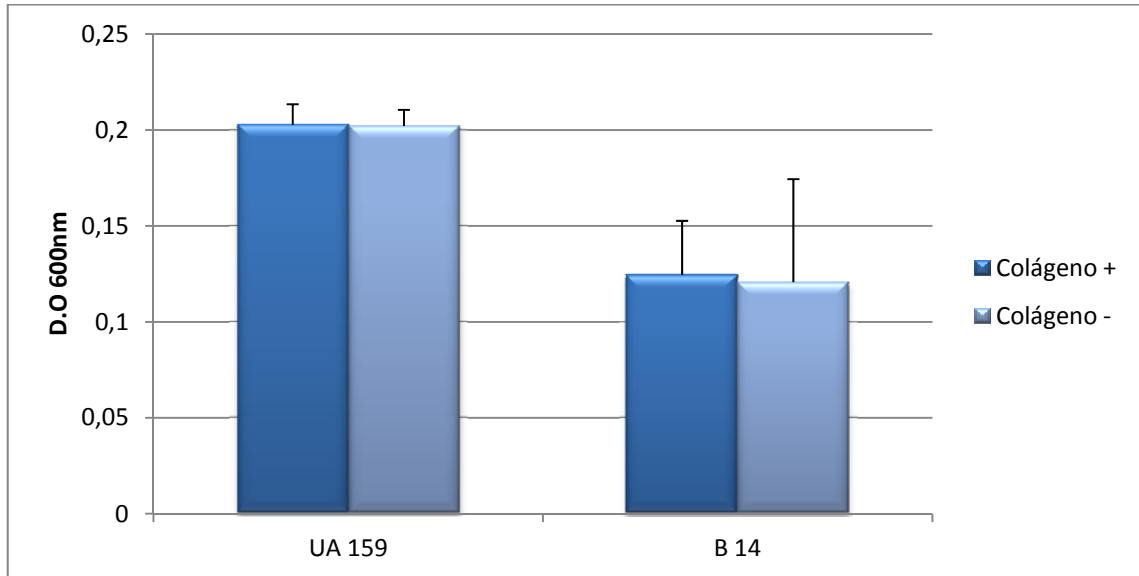
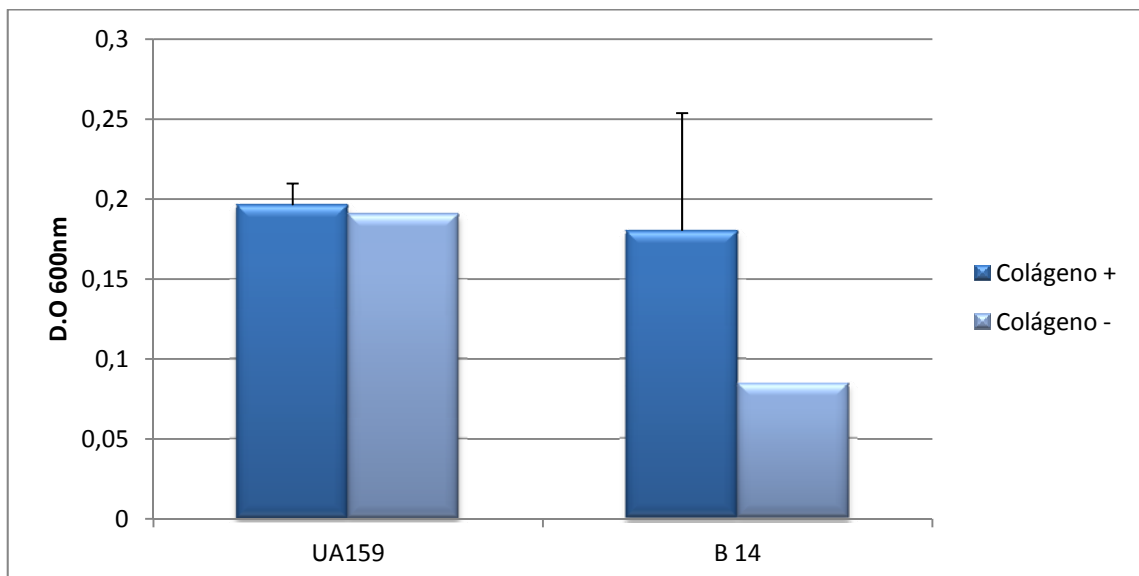


Figura 5 – Quantificação dos biofilmes desenvolvidos em TSB sem a suplementação com sacarose durante 24 h em superfícies tratadas ou não por colágeno por *S. mutans* UA159 e B14



Através da análise desses resultados, a metodologia de desenvolvimento de biofilmes ficou padronizada em duas etapas: a

primeira utilizando BM suplementado com sacarose 50 mM durante 3 h e seguida pela substituição por TSB sem suplementação de sacarose.

A Tabela 2 apresenta os resultados de formação de biofilme pelas cepas de *S. mutans* em superfícies de vidro tratadas ou não com colágeno. A superfície recoberta por colágeno prejudicou a formação de biofilme da cepa UA159, não portadora do gene *cnm*, porém não alterou o comportamento da cepa 7.1, igualmente *cnm* negativa. Ao contrário, as cepas selvagens portadoras de *cnm*, exceto OM50E e 61, foram beneficiadas pela presença de colágeno, apresentando maior formação de biofilme. A deleção do gene *cnm* promoveu redução na biomassa do biofilme na presença do colágeno em todas as linhagens mutantes, quando comparadas às respectivas cepas selvagens, evidenciando a influência do gene *cnm* na ligação ao colágeno. Na presença de colágeno, a maioria das linhagens mutantes apresentou uma diminuição na formação de biofilme, como observado para a cepa UA159. Os resultados do presente estudo sugerem que o colágeno influencia a formação do biofilme em cepas de *S. mutans*.

Tabela 2 - Quantificação dos biofilmes formados por *S. mutans* na presença e ausência de colágeno

Cepa	Sorotipo	Ausência de Colágeno	Presença de colágeno
UA 159	<i>c</i>	0,354 ¹ ± 0,084	0,279 ¹ ± 0,065
7.1	<i>c</i>	0,328 ± 0,064	0,318 ± 0,053
OMZ175	<i>f</i>	0,172 ² ± 0,020	0,290 ^{2, 4} ± 0,031
OMZ175Δ <i>cnm</i>		0,254 ³ ± 0,040	0,238 ^{3, 4} ± 0,021
NCTC11060	<i>f</i>	0,216 ⁵ ± 0,046	0,398 ^{5, 7} ± 0,087
NCTC11060Δ <i>cnm</i>		0,319 ⁶ ± 0,065	0,275 ^{6, 7} ± 0,0731
B14	<i>e</i>	0,106 ⁸ ± 0,015	0,148 ^{8, 9} ± 0,028
B14Δ <i>cnm</i>		0,135 ± 0,024	0,130 ⁹ ± 0,020
OM50E	<i>e</i>	0,323 ± 0,060	0,336 ¹⁰ ± 0,030
OM50EΔ <i>cnm</i>		0,405 ¹¹ ± 0,122	0,282 ^{10, 11} ± 0,020
LM7	<i>e</i>	0,302 ¹² ± 0,084	0,356 ^{12, 14} ± 0,040
LM7Δ <i>cnm</i>		0,348 ¹³ ± 0,078	0,310 ^{13, 14} ± 0,024
61	<i>k</i>	0,194 ± 0,021	0,200 ¹⁵ ± 0,030
61Δ <i>cnm</i>		0,210 ¹⁶ ± 0,018	0,186 ^{15, 16} ± 0,022
C2A4	<i>e</i>	0,190 ¹⁷ ± 0,030	0,229 ¹⁷ ± 0,043

Médias seguidas dos mesmos números apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

4.3 Verificação da expressão dos genes *spaP* e *brpA* em biofilmes de *S. mutans* na presença de colágeno

Os resultados da análise de expressão dos genes *spaP* e *brpA*, envolvidos em ligação ao colágeno e formação de biofilmes por *S. mutans* estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. A Tabela 3 evidencia a influência do gene *cnm* na formação de biofilmes, uma vez que a razão de expressão entre as cepas selvagens e respectivas mutantes foi calculada em cada condição e os valores apresentados representam o número de

vezes que cada gene foi expresso em relação às cepas selvagens. Na cepa OMZ, a deleção do gene *cnm* não influenciou a expressão do gene *spaP* independente da presença de colágeno. Por outro lado, OMZ175 expressou 1,8 vezes mais o gene *brpA* na presença de colágeno.

A deleção do gene *cnm* na cepa 61 levou a grandes alterações de expressão dos genes *spaP* e *brpA* na presença de colágeno. Na cepa 61 o gene *spaP* foi 9,1 vezes mais expresso na mutante na presença de colágeno, enquanto que o gene *brpA* foi 18,1 vezes mais expresso pela cepa selvagem nas mesmas condições.

Quando a influência do colágeno foi analisada, não foi verificada nenhuma diferença de expressão de *spaP* e de *brpA* tanto em OMZ175 como em seu mutante. No entanto, o gene *spaP* foi 9,7 vezes mais expresso na cepa 61 na presença de colágeno. No seu mutante, o gene *brpA* foi 3,6 vezes mais expresso na ausência de colágeno.

Tabela 3 – Influência do gene *cnm* na expressão gênica de células de *S. mutans* OMZ175, 61 e seus mutantes OMZ175 Δ *cnm* e 61 Δ *cnm* em biofilmes desenvolvidos na presença e ausência de colágeno

Cepas de <i>S. mutans</i>	Genes	Condição	Expressão relativa (S ^a /M ^b)
OMZ175	<i>spaP</i>	Com colágeno	ND
OMZ175	<i>spaP</i>	Sem colágeno	ND
OMZ175	<i>brpA</i>	Com colágeno	1,8*
OMZ175	<i>brpA</i>	Sem colágeno	ND
61	<i>spaP</i>	Com colágeno	-9,1***
61	<i>spaP</i>	Sem colágeno	ND
61	<i>brpA</i>	Com colágeno	18,1*
61	<i>brpA</i>	Sem colágeno	ND

a: cepa selvagem

b: cepa mutante

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

ND: nenhuma diferença ($p \geq 0,05$ ou razão $< 1,5$)

Tabela 4 – Influência do colágeno na expressão gênica de células de *S. mutans* OMZ175, 61 e seus mutantes OMZ175 Δ cnm e 61 Δ cnm em biofilmes

Cepas de <i>S. mutans</i>	Genes	Expressão relativa (CC ^a /SC ^b)
OMZ175	<i>spaP</i>	ND
OMZ175 Δ cnm	<i>spaP</i>	ND
OMZ175	<i>brpA</i>	ND
OMZ175 Δ cnm	<i>brpA</i>	ND
61	<i>spaP</i>	-9,7**
61 Δ cnm	<i>spaP</i>	ND
61	<i>brpA</i>	ND
61 Δ cnm	<i>brpA</i>	-3,6*

a: biofilme desenvolvido na presença de colágeno

b: biofilme desenvolvido na ausência de colágeno

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

ND: nenhuma diferença ($p \geq 0,05$ ou razão $< 1,5$)

4.4 Influência do gene *cnm* na interação de *S. mutans* com células endoteliais

Os resultados dos ensaios de internalização celular em HCAEC realizados com as cepas UA 159, 7.1, OMZ175 e OMZ175 Δ cnm, NCTC11060 e NCTC11060 Δ cnm, B14 e B14 Δ cnm, OM50E e OM50E Δ cnm, LM7 e LM7 Δ cnm, 61 e 61 Δ cnm e C2A4 e C2A4 Δ cnm estão demonstrados nas Figuras 6 a 17. Os resultados foram demonstrados através da quantificação em unidades formadoras de colônias (ufc) por ml das células bacterianas aderidas ou internalizadas recuperadas das células endoteliais.

Figura 6 - Avaliação de *S. mutans* UA159 (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24 h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)

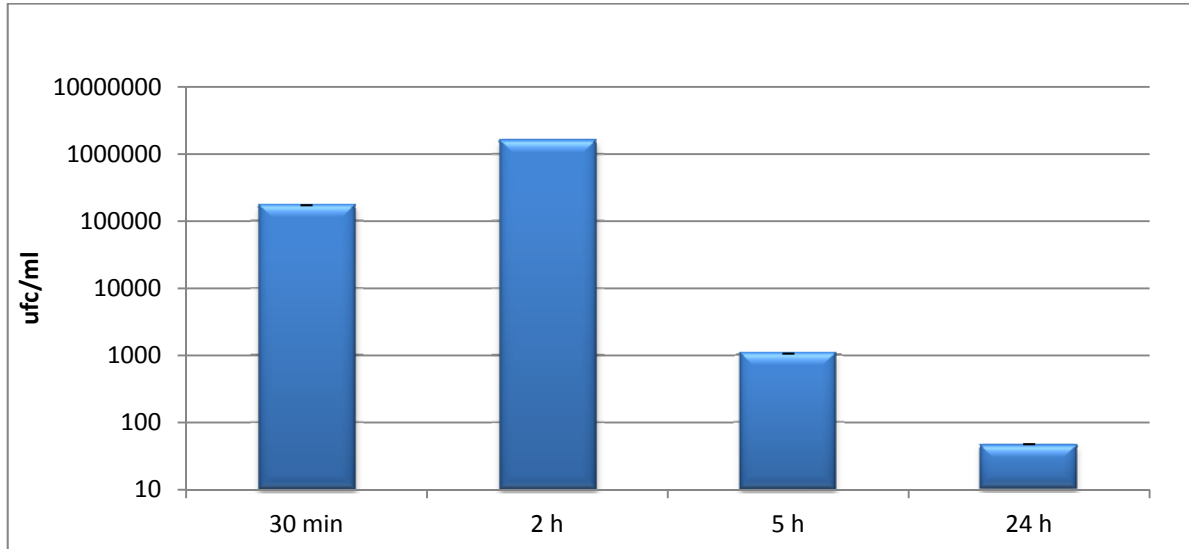


Figura 7 - Avaliação de *S. mutans* 7.1 (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24 h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)

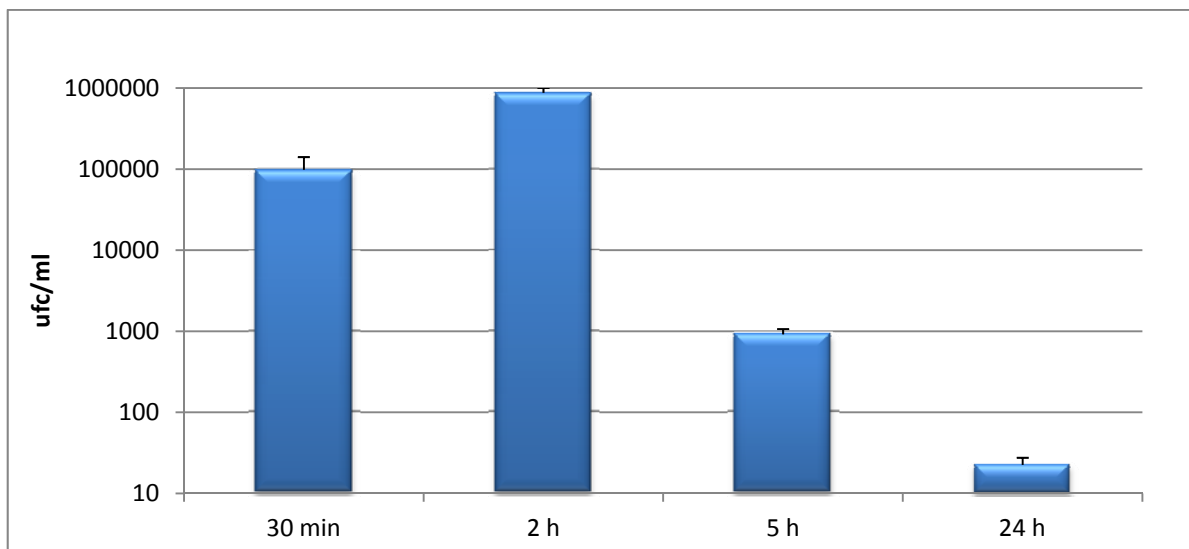
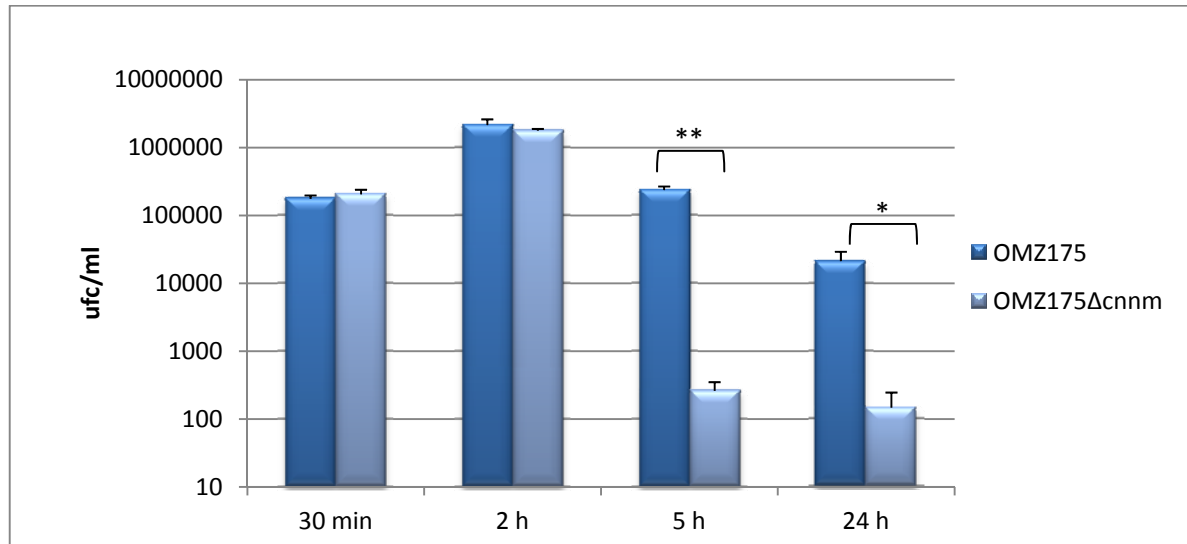
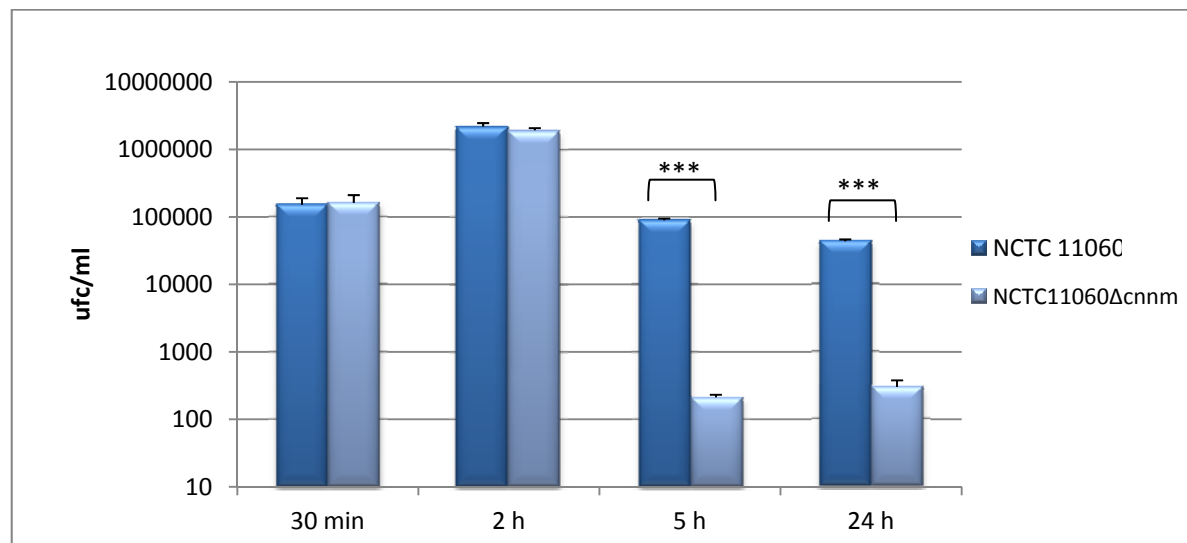


Figura 8 - Avaliação de *S. mutans* OMZ175 e OMZ175 Δ cnm (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24 h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)



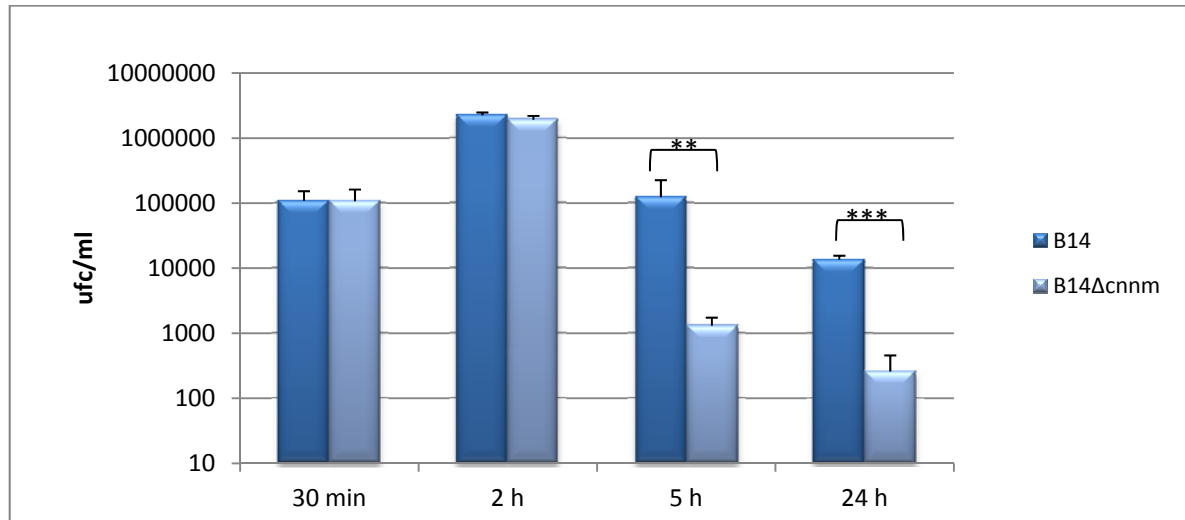
* $p < 0,05$
 *** $p < 0,001$

Figura 9 - Avaliação de *S. mutans* NCTC11606 e NCTC11606 Δ cnm (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24 h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)



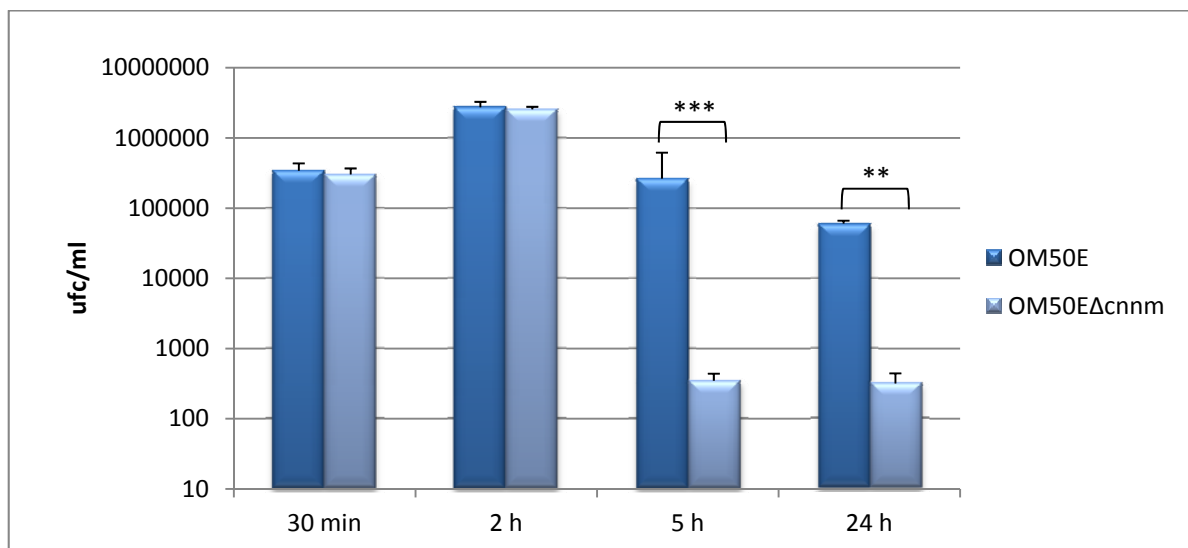
*** $p < 0,001$

Figura 10 - Avaliação de *S. mutans* B14 e B14 Δ cnm (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24 h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)



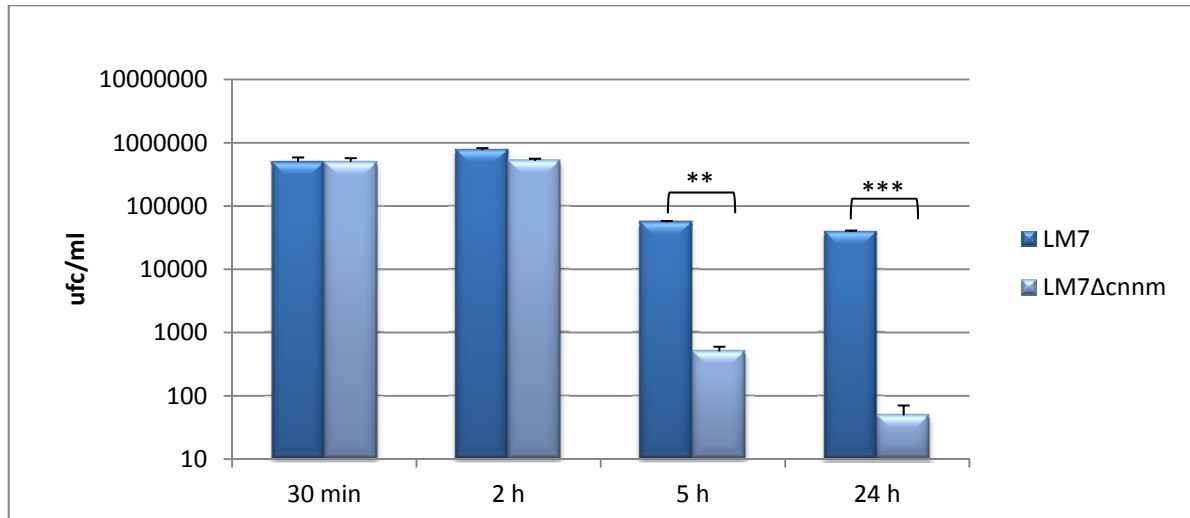
** $p < 0,01$
 *** $p < 0,001$

Figura 11 - Avaliação de *S. mutans* OM50E e OM50E Δ cnm (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24 h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)



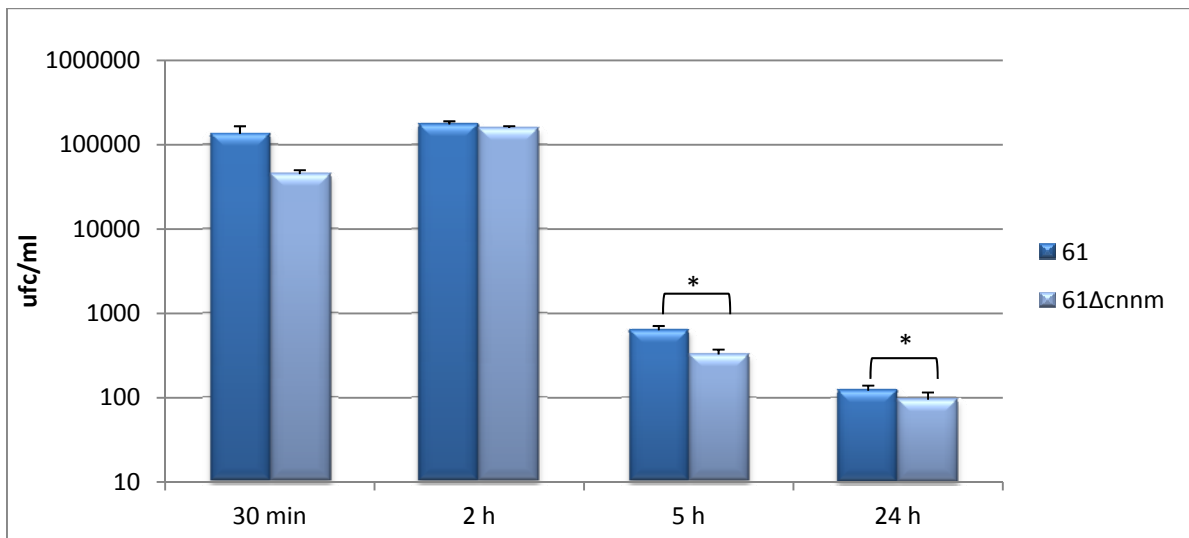
*** $p < 0,001$

Figura 12 - Avaliação de *S. mutans* LM7 e LM7 Δ cnm (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24 h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)



*** $p < 0,001$

Figura 13 - Avaliação de *S. mutans* 61 e 61 Δ cnm (ufc/ml) após 30 min, 2, 5 e 24h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)



* $p < 0,05$

Figura 14- Porcentagem das células recuperadas em relação ao inóculo após 30 min de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)

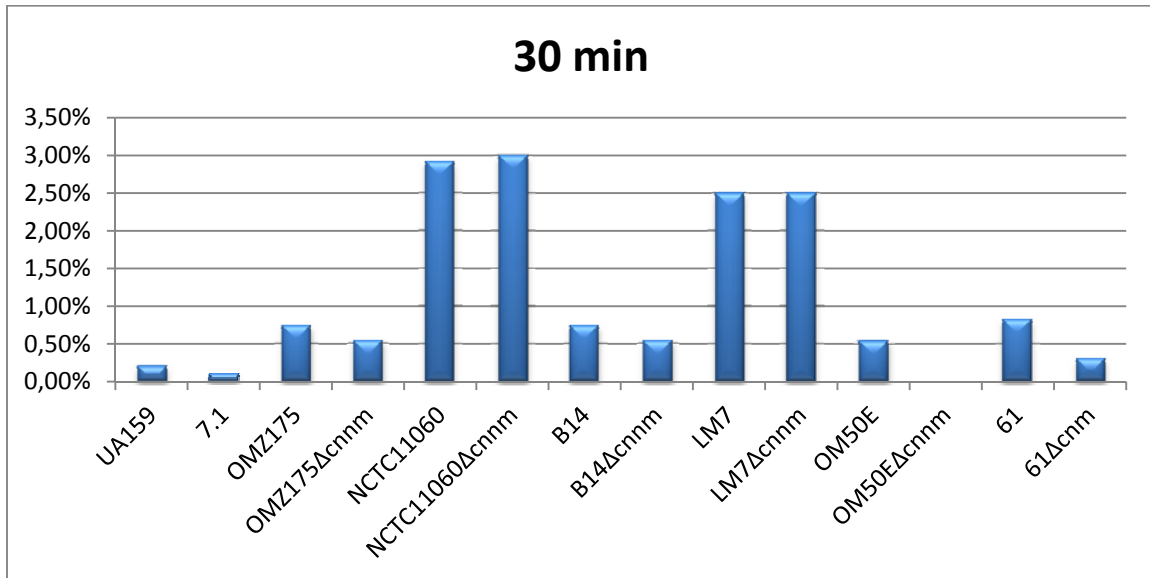


Figura 15- Porcentagem das células recuperadas em relação ao inóculo após 2h de interação com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)

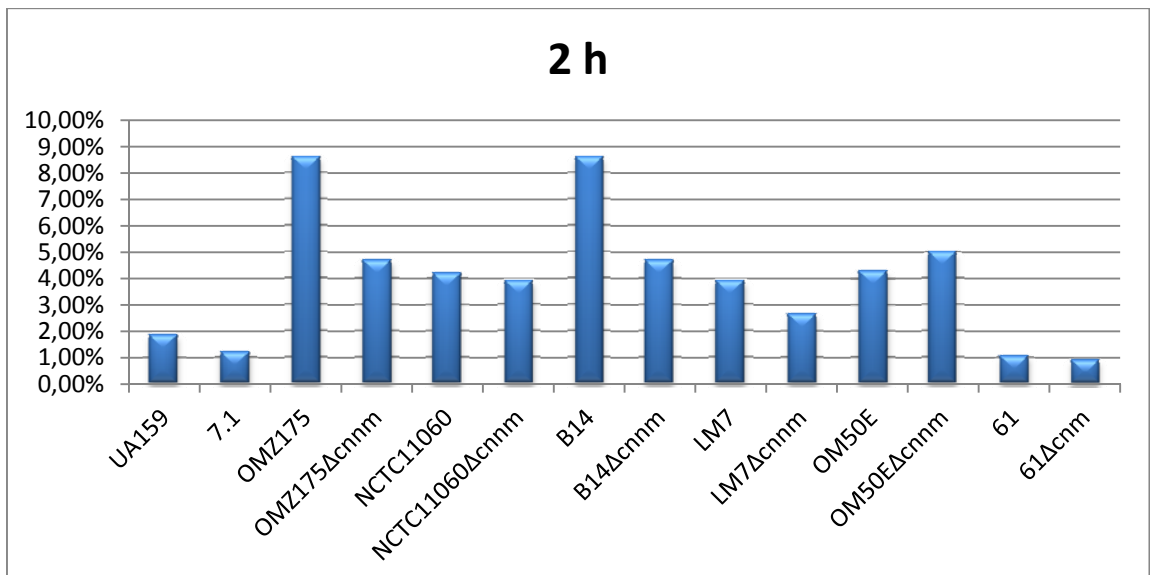


Figura 16- Porcentagem das células recuperadas em relação ao inóculo após 5h de interação (2h de contato e 3h na presença de antibióticos) com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)

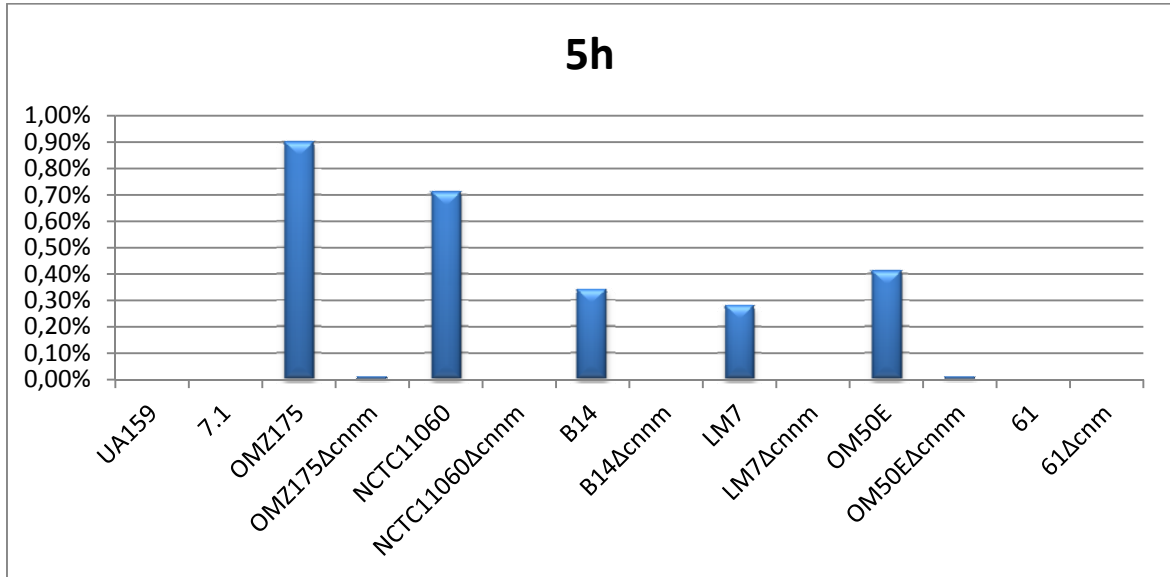
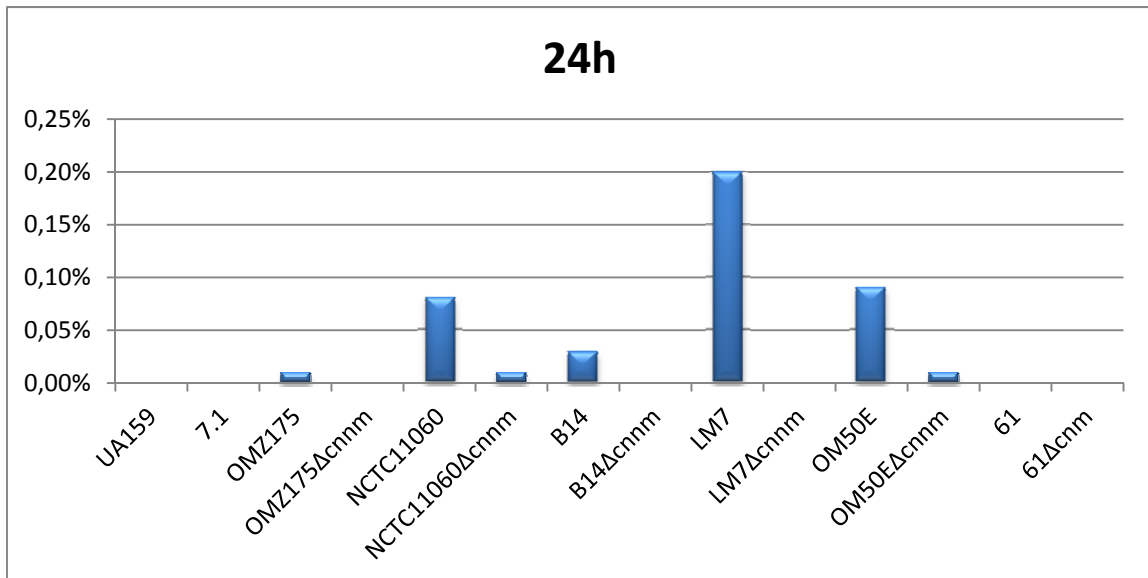


Figura 17- Porcentagem das células recuperadas em relação ao inóculo após 24h de interação (2h de contato e 22h na presença de antibióticos) com com Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC).



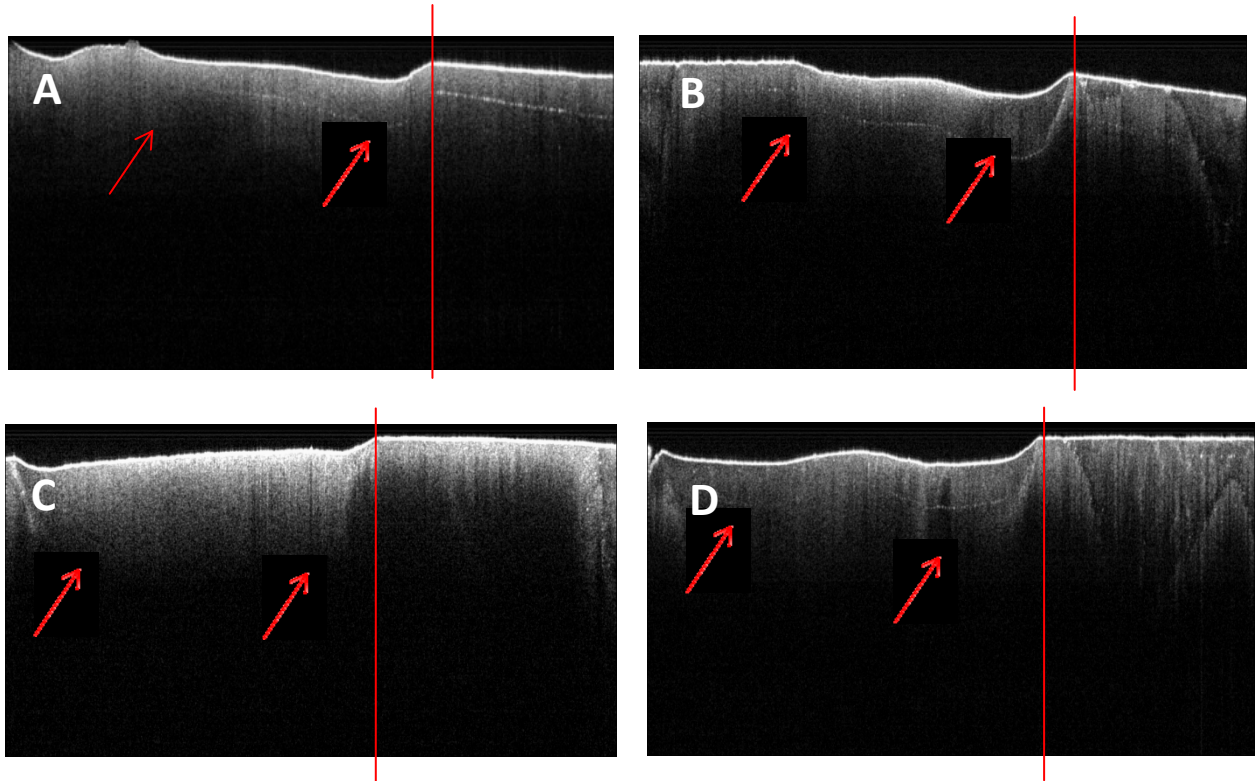
4.5 Avaliação da desmineralização da dentina pela técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

Através da mensuração da profundidade de dentina desmineralizada, em μm , o potencial cariogênico das cepas OMZ175 e 61 foi comparado ao de seus respectivos mutantes e os resultados estão apresentados na Tabela 5. O teste estatístico utilizado foi o Teste *t* de Student para amostras emparelhadas, considerando um nível de significância de 5%. Não foi observada diferença estatística entre ação das as cepas selvagens e mutantes.

Tabela 5 – Profundidade de desmineralização da dentina, após desafio cariogênico de 7 dias na presença de cepas de *S. mutans*, avaliada pela Tomografia por Coerência Óptica (OCT).

	OMZ175	OMZ Δ cnm	61	61 Δ cnm
Profundidade de desmineralização ($\mu\text{m} \pm \text{dp}$)	349,43 \pm 79,63	395,00 \pm 36,44	365,62 \pm 36,17	349,72 \pm 27,44

Figura 18 - Imagem ilustrativa obtida através da Tomografia de Coerência Óptica (OCT) em dentina submetida a desafio cariogênico pelas cepas de *S. mutans* nos diferentes grupos



A barra vertical separa a dentina hígida da afetada por cárie obtida artificialmente. As setas apontam a região desmineralizada da dentina afetada por cárie e a barra divide a região exposta ao desafio da região coberta pelo esmalte durante todo o experimento A - Ceba OMZ175; B - Ceba OMZ175 Δ cnm; C - Ceba 61; D - Ceba 61 Δ cnm.

5 DISCUSSÃO

Esse estudo teve como objetivo principal estudar a influência da presença do gene *cnm* em cepas de *S. mutans* conhecidas na formação do biofilme na presença ou ausência de colágeno e no processo de invasão de células endoteliais humanas. O gene *cnm* tem sido relatado como o principal fator de adesão ao colágeno por *S. mutans* e provavelmente um dos responsáveis pela detecção do microrganismo em bacteremias, desenvolvimento de endocardite infectiva e arteriosclerose (Abranches et al., 2011; Nakano et al., 2010, 2012). Porém são poucos os grupos de pesquisa existentes que relacionam *S. mutans* e doenças sistêmicas, levando a um reduzido número de informações na literatura. Desse modo, o presente estudo permitiu ampliar o conhecimento do papel de *S. mutans* fora da cavidade oral.

5.1 Identificação e classificação em sorotipos dos isolados clínicos de *S. mutans*

O isolamento, identificação e sorotipagem de cepas da cavidade oral tiveram como objetivo selecionar sorotipos prevalentes na população para serem incluídos no estudo. A inclusão de isolados clínicos é importante em estudos desta natureza, uma vez que os resultados e conclusões encontradas nessas cepas podem corroborar ou não estudos realizados apenas em cepas padrão.

O estudo foi delineado no sentido de isolar e identificar o maior número de cepas provenientes de cada voluntário, acreditando-se que assim, a possibilidade de encontrar sorotipos de *S. mutans* de menor prevalência na população, como *f* e *k*, seria aumentada (Nakano et al., 2010b). Porém, apesar de estratégia empregada nesse estudo, além do sorotipo *c*, apenas dois outros sorotipos foram identificados e somente a partir de um paciente conseguiu-se identificar mais de um sorotipo.

No presente estudo, a maioria dos isolados clínicos foi identificado como sorotipo *c* e a caracterização das cepas mostrou que nenhum destes era portador do gene *cnm*. Além do sorotipo *c*, foram identificados um isolado clínico do sorotipo *e* (C2A4) e um isolado clínico pertencente ao sorotipo *k* (61), ambos portadores do gene *cnm*. Com exceção do sorotipo *e*, esses resultados foram similares aos estudos epidemiológicos que demonstraram a predominância do sorotipo *c* na população (cerca de 80%), seguidos pelo sorotipo *e*, prevalente em aproximadamente 20%. Os sorotipos *f* e *k* são raramente detectados, sendo encontrados em cerca de 2% da população (Hirasawa, Takada, 2003; Nakano et al., 2004; Shibata et al., 2003). As cepas do sorotipo *k* isoladas neste estudo pertencem a um mesmo paciente e foi a primeira vez que esse sorotipo foi isolado nas Américas.

A disseminação de bactérias orais na corrente circulatória é muito comum em pacientes submetidos a procedimentos dentais como exodontias, tratamento endodôntico e cirurgia periodontal (Li et al., 2000). Nesse contexto, *S. mutans* pode ser ocasionalmente isolado da corrente sanguínea de pacientes com endocardite infectiva (Nemoto et al., 2008; Que, Morreillon, 2011). Em 2001, um grupo de pesquisadores japoneses isolou de corrente sanguínea de pacientes com endocardite ou submetidos à extração dental, um sorotipo diferente de *S. mutans*, não tipado pelos três sorotipos conhecidos na época (Fujiwara et al., 2001). A partir desse momento, alguns estudos foram sucessivamente sendo realizados caracterizando um novo sorotipo, chamado de *k*, e que não apresentava a cadeia de glicose lateral no polissacarídeo específico determinante da espécie (Nakano et al., 2004a, b). No mesmo período, estudos epidemiológicos realizados no Japão e na Tailândia demonstravam a distribuição dos diferentes sorotipos na população estudada. Essas publicações apresentavam o sorotipo *c* como o mais predominante na população (70 a 80%), seguidos pelo sorotipo *e* (20%). Os sorotipos *f* e *k* (5%) foram raramente detectados (Hirasawa e Takada, 2003; Nakano et al., 2004, 2011; Shibata et al., 2003).

Nas publicações de Sato et al. (2004) e Han et al. (2006), uma proteína de superfície com atividade de ligação ao colágeno em *S. mutans* foi identificada e caracterizada. A sequência de aminoácidos da proteína Cnm, apresentava uma alta similaridade com uma adesina de ligação ao colágeno presente em espécies de estafilococos. Em sequência, outros estudos relataram a caracterização do gene *cnm* de *S. mutans* como sendo o codificador da proteína de ligação ao colágeno nesta espécie (Nakano et al., 2010; Nomura et al., 2009). Os pesquisadores também apresentavam a porcentagem de detecção do gene *cnm* em isolados clínicos da população Japonesa, Tailandesa e da Ilha Fiji e correlacionaram a maior incidência da proteína Cnm em isolados pertencentes aos sorotipos *f* e *k*. Recentemente Nomura et al. (2012) identificaram e caracterizaram outra proteína de ligação ao colágeno presente principalmente em cepas de *S. mutans* sorotipo *k*, porém *cnm* negativas, abrindo novas perspectivas para investigação do potencial de virulência extra-oral deste patógeno.

5.2 Influência do gene *cnm* na formação de biofilmes por *S. mutans* na presença de colágeno

A capacidade de adesão e formação de biofilmes é considerada uma importante característica de virulência de *S. mutans* (Banas, Vickerman, 2003; Bowen, Koo, 2011; Koo et al., 2010; Lemos et al., 2005). O biofilme formado na superfície dental recoberta por proteínas salivares representa um vasto campo de estudos em Cariologia, principalmente em pesquisas realizadas com enfoque sobre o metabolismo celular e mecanismos de resistência ao estresse (Bowen, Koo, 2011; Lemos, Burne, 2008). A realização de estudos focando a colonização de *S. mutans* em outras áreas do organismo humano, como coração ou cérebro representa uma nova perspectiva em relação ao futuro do conhecimento da espécie (Abranches et al., 2011; Nakano et al., 2011).

A parede arterial é uma estrutura altamente organizada composta células e matriz extracelular. Em sua camada mais interna, é constituída por células endoteliais sobre uma membrana rica em laminina, fibronectina e colágeno tipo IV. Em sua porção média, células musculares lisas são envolvidas por uma membrana basal embebida por vários tipos de colágeno, fibronectina e proteoglicanos. Após uma injúria arterial, assim como na arteriosclerose, acontece uma profunda mudança na composição da matriz extracelular e nessa condição as células musculares lisas passam a sintetizar uma maior quantidade de colágeno tipo I e III, elastina e fibronectina, aumentando o depósito dessas proteínas na matriz extracelular; sua degradação também é constatada na doença, através do aumento da síntese de proteinases. A combinação entre síntese e degradação de substratos gera uma remodelação da matriz, expondo fragmentos de colágeno tipo I, IV e elastina (Adiguzel et al., 2009).

Da mesma forma, a patogênese da endocardite também se relaciona com a destruição da matriz extracelular. Vários são os tipos de lesão que acontecem no endotélio valvular, como fluxo de sangue turbulento associado a doenças congênitas ou válvulas protéticas, colocação de eletrodos ou catéteres, ou a repetida injeção intravenosa de substâncias tóxicas em pacientes usuários de drogas injetáveis. As lesões físicas no endotélio resultam em exposição das proteínas da lâmina basal, produção de fatores teciduais e deposição de fibrina e plaquetas, como tentativa de reparação. Desse modo, a endocardite trombótica não bacteriana, torna-se um excelente ambiente para ligação e desenvolvimento de microrganismos, tornando-se endocardite infectiva (Que, Moreillon, 2011).

Isto posto, surgiu, então, a hipótese de que cepas de *S. mutans* poderiam ser beneficiadas pela presença do colágeno tipo I na formação de biofilmes. Apesar de Abranches et al. (2011) não ter verificado a influência do gene *cnm* na formação de biofilmes por *S. mutans*, uma otimização na metodologia empregada nos experimentos de formação de

biofilme evidenciou as diferenças de comportamento não antes observadas.

O desenvolvimento de biofilmes em placas de polipropileno recobertas com lamínulas de vidro demonstrou que *S. mutans* formou maior biomassa na superfície de vidro, nas condições estabelecidas neste estudo. A concentração de colágeno empregada neste estudo seguiu o proposto por Nomura et al. (2009) que estabeleceram a melhor concentração de colágeno (100 µg/ml) para o desenvolvimento de biofilmes.

A estratégia de troca dos meios de cultura foi fundamental para a evidenciação da influência do colágeno na formação de biofilme por cepas de *S. mutans*, portadoras ou não do gene *cnm*. O meio quimicamente definido proposto por Loo et al. (2000) chamado de Biofilm Medium (BM) e suplementado por 50 mM de sacarose (Standar et al., 2010) foi o mais adequado à formação de biofilme por *S. mutans*. Conforme os resultados apresentados foi verificado que os biofilmes de *S. mutans* desenvolvidos na presença de BM atingem um máximo de biomassa no período de três horas, ocorrendo porém uma redução após 24 horas, provavelmente pela baixa concentração de nutrientes. O meio TSB, bastante rico em nutrientes, não se mostrou adequado para ser empregado desde o início dos ensaios. Além de não permitir a formação de grande quantidade de biofilme, embora os dados não mostrem, apresentava-se frouxamente aderido à superfície, tornando difícil sua mensuração. A sacarose associada ao TSB mascarou a evidenciação da influência do colágeno e os melhores resultados foram obtidos quando as duas metodologias foram associadas.

Assim sendo, BM mostrou-se importante na fase inicial do desenvolvimento de biofilmes por *S. mutans*, permitindo visualizar a possível influência do colágeno. No entanto, enquanto os ensaios com duração de três horas avaliam o processo de adesão bacteriana ao substrato, os estudos com duração de 24 horas configuram o estabelecimento de biofilme (Wen, Burne, 2002).

No presente estudo, a presença do colágeno influenciou a formação de biofilme para a maioria das cepas selvagens. A presença de *cnm* geralmente favoreceu a formação de biofilmes, enquanto que as cepas não portadoras apresentaram resultados variáveis. A deleção do gene *cnm*, em geral, promoveu redução na biomassa do biofilme na presença de colágeno em todas as linhagens mutantes, mostrando o papel do gene neste processo.

Esses resultados estão em linhas gerais em concordância com os obtidos por Nomura et al. (2009) que utilizaram outras cepas dos mesmos sorotipos. Os autores realizaram experimentos de biofilme, utilizando colágeno como substrato, e mostraram que a presença do gene *cnm* contribuiu para o aumento de biomassa. Abranches et al. (2011) realizando ensaios de formação de biofilme na presença de saliva com as cepas OMZ175, OMZ175 Δ *cnm*, B14 e B14 Δ *cnm*, obtiveram resultados semelhantes aos nossos somente com a cepa OMZ175, sugerindo que a formação de biofilme para cepas *cnm* positivas seria cepa específica. Os resultados do presente estudo demonstram que as cepas selvagens de *S. mutans* portadoras do gene *cnm*, exceto as amostras 61 e OM50E, apresentaram uma capacidade de adesão mais elevada na presença de colágeno, principalmente na formação do biofilme. Nas cepas 61 e OM50E, apesar de portadoras do gene *cnm*, esse favorecimento pelo colágeno não foi verificado.

Embora não seja a única forma de *S. mutans* se ligar ao colágeno, os resultados obtidos no presente estudo sugerem fortemente que a presença do gene *cnm* tem uma relação positiva na formação de biofilme na presença de colágeno. Porém, nas linhagens mutantes verificou-se sempre maior formação de biofilme na ausência de colágeno. A Cnm é uma proteína de superfície relativamente grande, com aproximadamente 120 kDa (Sato et al., 2004). A mudança morfológica da parede bacteriana poderia influenciar o comportamento das cepas mutantes, assim como a modificação da expressão da SpaP e BrpA, que também são proteínas de superfície com adesão ao colágeno (Brady et al., 2010). Os resultados dos

experimentos de expressão gênica por PCR em Tempo Real mostram justamente essa diferença nas cepas mutantes e serão discutidos na seção pertinente.

5.3 Verificação da expressão dos genes *spaP* e *brpA* em biofilmes de *S. mutans* na presença de colágeno

A verificação de expressão gênica foi realizada apenas para os genes *spaP* e *brpA*, que codificam proteínas importantes na adesão ao colágeno. No presente estudo, a expressão destes genes foi investigada nas cepas OMZ175 (sorotipo *f*) e no isolado clínico 61 (sorotipo *k*) além de suas respectivas linhagens mutantes.

A proteína SpaP é a principal proteína de superfície de *S. mutans* que apresenta função de adesina, ligando o microrganismo à película adquirida do esmalte. Além disso, SpaP pode apresentar outras funções, como a ligação ao colágeno e à fibronectina. A ligação ao colágeno é realizada através da porção gp-340 da proteína (Brady et al., 2010; Nobbs et al., 2009) tendo sido relacionada como expressa em casos de bacteremia (Nakano et al., 2006). A proteína BrpA é também considerada uma das principais responsáveis pela capacidade de formação de biofilmes em *S. mutans* (Wen, Burne, 2002; Wen et al., 2005) e por isso selecionada para o presente estudo.

A Tabela 3 comparou a expressão dos genes entre as linhagens selvagem e mutante nas diferentes condições, procurando evidenciar a importância do gene *cnm* na formação de biofilme. A presença de *cnm* nos biofilmes formados com colágeno permitiu maior expressão de *spaP* apenas no mutante de 61 (9,1). Por outro lado, os resultados mostram que a presença do gene *cnm* nas duas cepas selvagens, OMZ e 61, na presença de colágeno, levou à maior expressão de *brpA* (1,8 e 18,1 vezes, respectivamente).

Tanto na cepa selvagem OMZ175 como na respectiva linhagem mutante, os genes *spaP* e *brpA* não apresentaram expressão diferencial em

relação à presença ou ausência do colágeno, conforme pode ser verificado na Tabela 4. No entanto, analisando o resultado da formação de biofilme, a cepa OMZ175 obteve maior biomassa na presença de colágeno do que na sua ausência. Com relação à cepa 61, o gene *spaP* foi 9,7 vezes mais expresso na ausência de colágeno, e na cepa mutante, a expressão do gene *brpA* foi 3,6 vezes maior também na ausência de colágeno.

Esses resultados mostraram que a presença ou ausência do colágeno não interferiu, no momento estudado, com a capacidade de *S. mutans* expressar os genes codificadores dessas importantes proteínas de ligação e que a expressão dos genes *spaP* e *brpA* comportaram-se como cepa dependente.

Provavelmente a expressão da proteína Cnm nas cepas OMZ175 e 61 pode ser diferente, provocando uma modificação na parede celular, afetando a expressão de outras proteínas superficiais de maneira desigual. Como proposto por Nomura et al. (2009), a porção intermediária do gene codificador da proteína Cnm de três cepas independentes apresenta algumas diferenças cepa específicas, que poderiam justificar os resultados verificados neste estudo.

Outra hipótese formulada para a diferença dessa expressão entre as cepas OMZ175 e 61 pode ser atribuída ao momento de investigação. Tanto *spaP* quanto *brpA* podem ter sido mais expressos no início da formação do biofilme, no momento de ligação ao colágeno. Essa expressão pode não ser necessária para *S. mutans* no período de 24 horas, quando o biofilme já estava estabelecido. Estudos futuros realizando a verificação da expressão dos genes em outros momentos de formação de biofilme podem elucidar essa questão.

Por outro lado, estudos de microarranjos poderiam esclarecer os genes envolvidos em cada fase da formação do biofilme colágeno dependente, correlacionando seu papel durante o acúmulo da biomassa.

5.4 Influência do gene *cnm* na interação de *S. mutans* com células endoteliais

Nos últimos 20 anos estudos relatam que pacientes com periodontite crônica severa apresentam significativo aumento no risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares incluindo arteriosclerose, infarto do miocárdio e acidente vâsculo cerebral (Alfakry et al., 2011; Belstron et al., 2012; Ford et al., 2010; Hucka et al., 2011). A capacidade de invasão a células epiteliais e endoteliais por *Porphyromonas gingivalis* é reconhecida há bastante tempo e já foi amplamente relatada na literatura (Amar et al., 2009; Dorn et al., 1999; Dorn et al., 2000; Kozarov et al., 2005; Nakano et al., 2011; Zeitune, et al., 2011) e todos os estudos relacionam a invasão a células endoteliais *in vitro* como um indício do desenvolvimento da doença *in vivo*.

Porém a interação de *S. mutans* e células endoteliais foi verificada pela primeira vez por Abranches e colaboradores em 2009. Nesse estudo, os pesquisadores associaram a capacidade de internalização da espécie ao sorotipo, pois cepas de sorotipos *e* e *f* eram mais invasivas do que aquelas pertencentes ao sorotipo *c*. No mesmo ano, duas outras publicações (Nakano et al., 2009; Nomura et al., 2009) caracterizavam molecularmente a proteína de ligação ao colágeno, Cnm, codificada pelo gene *cnm*, encontrado com mais frequência em sorotipos *f* e *k*. Em 2011, Abranches e colaboradores encontraram uma associação positiva entre o gene *cnm* e a invasão às células endoteliais. Os autores realizaram ensaios de invasão (5 horas) com as cepas padrão portadoras do gene *cnm* e seus respectivos mutantes e verificaram que a capacidade invasiva dos mutantes foi extremamente reduzida, comprovando a relevância do gene para tal fenomeno. Os resultados encontrados no presente estudo nos experimentos de invasão em período de 5 horas estão em concordância com os verificados por Abranches et al. (2011).

Com relação ao processo de adesão, a interação entre as cepas de *S. mutans* e as células endoteliais foi investigada após 30 minutos e 2

horas de contato. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a presença do gene *cnm* não foi relevante nos processos de adesão celular. As cepas selvagens e mutantes do gene *cnm* seguiram o mesmo padrão de adesão nos dois períodos de tempo investigados e não apresentaram diferença significativa entre elas.

Estes achados diferem de Abranches et al. (2011) que verificaram diferença significativa entre as cepas selvagens e mutantes após 30 minutos de contato. Para verificar a adesão, os pesquisadores empregaram citocalasina D, um agente que inibe a entrada de bactérias nas células por alterações no citoesqueleto (Tymchenko et al., 2012). No presente estudo, a escolha de um agente de inibição para invasão não foi utilizado. A escolha pelo método de interação total, ou seja, a análise tanto das células aderidas quanto das internalizadas, foi embasada em alguns estudos sobre o comportamento celular para a verificação da adesão bacteriana. A citocalasina D está relacionada com a mudança conformacional das células, através da perturbação do citoesqueleto (Tymchenko et al., 2012). A substância não é tóxica às células, e a reversibilidade da deformação é rapidamente observada quando é retirada do contato celular através de lavagem. Apesar desse fenômeno, Santos et al. (2009), observaram que a presença da Citocalasina D influencia de maneira não regular a adesão de alguns tipos de *Streptococcus agalaciae*, podendo aumentar ou diminuir a ligação das cepas bacterianas de maneira aleatória. Certamente a substância impede a internalização bacteriana, quando esse é o objetivo do estudo, porém para a análise de adesão, os valores podem representar falsos positivos ou negativos.

Além disso, diferenças no cultivo de *S. mutans* provavelmente justificam os resultados conflitantes. No presente estudo, os inóculos foram preparados a partir de subcultura e os ensaios foram, portanto, realizados na fase logarítmica de crescimento, ao contrário do estudo anterior que emprega as bactérias na fase estacionária (Abranches et al., 2011). As fases logarítmica e estacionária representam dois momentos metabólicos muito distintos das células bacterianas e essa diferença

poderia também influenciar a expressão de genes envolvidos no processo. Com o propósito de confirmarmos essa possibilidade, um ensaio utilizando as cepas OMZ175 e OMZ175 Δ cnm na fase estacionária foi realizado e a hipótese foi confirmada (APÊNDICE C).

Os resultados com os isolados clínicos 61 e C2A4 portadores do gene *cnm* seguem a tendência de adesão e de propriedades invasivas das cepas padrões, embora em menor proporção quando comparadas com a cepa OMZ175. A baixa capacidade invasiva observada pelas linhagens mutantes 61 Δ cnm sugere também que o gene *cnm* desempenha função importante no processo de invasão de *S. mutans* em células endoteliais.

Apesar da pequena quantidade de bactérias recuperadas após 24 h de invasão, os resultados mostram capacidade de persistência bacteriana intracelular por todas as cepas estudadas, fato de extrema importância em doenças infecciosas (Moreillon, Que, 2004; Que, Moreillon, 2011). Além disso, exceto na cepa 61, a importância do gene *cnm* ficou evidenciada na persistência das cepas de *S. mutans* em células endoteliais. A persistência intracelular bacteriana é considerada um fator de fundamental nas doenças cardíacas descritas, pois podem se tornar reservatórios bacterianos além de propiciar uma intensa resposta inflamatória local, aumentando a gravidade da patologia (Epstein et al., 2012; Nagata et al., 2011).

Apesar das evidências, Cnm não deve ser a única proteína envolvida na invasão de células endoteliais. Estudo recente de Nagata et al. (2011) demonstrou que uma cepa de *S. mutans* sorotipo *c* proveniente de placa dental, apresenta capacidade alta de invasão a células endoteliais de aorta, comparada com outros estreptococos orais. Também quando comparada a outros estreptococos orais, a cepa estudada demonstrou a maior capacidade de persistência celular após 24 horas, e provocou um grande aumento de citocinas intracelular.

Além disso, Nomura et al. (2012) descreveram e caracterizaram a proteína Cbm, com afinidade ao colágeno, em cepas de *S. mutans*. As propriedades de adesão celular em Human Umbilical Vein Endothelial Cells

(HUVEC) mostraram a importância dessa proteína em cepas não portadoras de *cnm*.

5.5 Avaliação da desmineralização da dentina pela técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A cárie dental é uma doença microbiana que atinge o tecido calcificado da estrutura dental através de um processo dinâmico, gerando a desmineralização da sua porção inorgânica e destruição da porção orgânica. A doença envolvendo as coroas dentais afetam pessoas de todas as idades em todas as partes do mundo. Em contraste, cáries nas superfícies radiculares ocorrem somente quando há perda de inserção do tecido periodontal afetando então a população adulta com mais frequência. Nesses casos, há a exposição ao meio bucal do cimento e dentina radiculares, rica em colágeno tipo I.

O teste de indução de cárie *in vitro*, utilizando microrganismos, é um ensaio que apresenta boa semelhança no padrão de degradação do colágeno quando comparado com lesões naturais. O sistema bacteriano também apresenta a vantagem de ser mais rápido e de fácil execução, substituindo estudos *in vivo*.

O cuidado com a escolha das amostras dentais utilizadas no desafio cariogênico é um fator de primordial importância. No interior dos canalículos dentinários, são encontrados prolongamentos odontoblásticos que reagem a estímulos externos produzindo mais dentina (Love, Jenkinson, 2009), resultando em grandes diferenças estruturais entre a dentina proveniente de um dente hígido, cariado ou erupcionado (Costa et al., 2002). Em Azevedo (2012) essa questão foi levantada e a autora utilizou amostras de dentina provenientes de elementos inclusos e erupcionados, concluindo que o substrato dentinário interfere qualitativamente nas características superficiais da dentina afetada por cárie, observando-se desmineralização superficial mais uniforme em dentina proveniente de dentes inclusos.

No presente estudo, o desafio cariogênico foi realizado de acordo com a metodologia empregada por Azevedo (2012). A autora desenvolveu os ensaios microbiológicos de seu estudo no Laboratório de Microbiologia Oral (ICB-USP) empregando a cepa de *S. mutans* UA159. Com a finalidade de comparação, este estudo utilizou também fragmentos de elementos inclusos, além da mesma metodologia em relação ao tempo de indução, meio de cultura (TSB) e a concentração de sacarose (5%), além da mensuração da desmineralização realizada nas mesmas condições.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram uma capacidade muito maior de desmineralização da dentina das cepas de *S. mutans* OMZ175 e 61, portadoras do gene *cnm*, em relação ao obtido por Azevedo (2012) usando a cepa UA159. Embora uma análise estatística entre os dois estudos não possa ser realizada, Azevedo (2012) verificou média de desmineralização dentinária 257,5 μm , enquanto que no presente estudo a desmineralização foi muito maior. Assim a análise feita pelo OCT nos padrões de descalcificação entre as cepas UA159, OMZ175 e 61, mostra uma maior agressividade nas lesões obtidas pelas cepas de sorotipo *f* e *k*, compradas com a cepa do sorotipo *c*. Acredita-se que estudo empregando maior número de cepas do mesmo sorotipo poderia esclarecer o papel de *cnm* como fator de virulência para cárie dentinária.

No entanto, quando a comparação é feita entre as cepas 61 e OMZ175 com seus respectivos mutantes, não foi observada diferença significativa. Isso pode ter sido resultado da metodologia empregada, com a concentração de sacarose de 5%, mais alta do que nos ensaios de formação de biofilme, no qual utilizamos 1,7%. A alta concentração de sacarose pode ter mascarado os resultados entre as cepas selvagens e mutantes. A possível diferença no início da colonização de *S. mutans* na dentina, beneficiada pelo gene *cnm* de ligação ao colágeno não se tornou aparente. Estudos futuros serão realizados, otimizando tanto a concentração de sacarose, quanto o período de tempo da indução poderão esclarecer o papel de *cnm* na desmineralização dentinária.

6 CONCLUSÕES

- O gene *cnm* influenciou a formação de biofilmes dependente de colágeno.
- O gene *cnm* não interferiu na adesão de *S. mutans* às células endoteliais.
- O gene *cnm* influenciou a invasão de *S. mutans* em células endoteliais.
- A persistência de *S. mutans* em células endoteliais apresentou-se cepa dependente.
- O gene *cnm* não interferiu no potencial cariogênico de *S. mutans* pelo modelo de estudo empregado.

REFERÊNCIAS*

- Abranches J, Candella MM, Wen ZT, Baker HV, Burne RA. Different roles of EIIAB^{Man} and EII^{Glc} in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2006;188:3748-56.
- Abranches J, Miller JH, Martinez AR, Simpson-Haidaris PJ, Burne RA, Lemos, JA. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. Infect Immun. 2011;79:2277-84.
- Adguzel E, Ahmad PJ, Franco C, Bendeck MP. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. Vasc Med. 2009;14:73-89.
- Alfakry H, Paju S, Sinisalot J, Nieminen MS, Valtonens V, Saikku P, Leinonem M, Pussinem PJ. Periodontopathogen and host-derived immune response in acute coronary syndrome. Scan J Immunol. 2011;74:383-9.
- Amar S, Wu S, Madan M. Is Porphyromonas gingivalis cell invasion required for atherogenesis? Pharmacotherapeutic implications. J Immunol. 2009;182:1584-92.
- Armstrong WG. The composition of organic films formed on human teeth. Caries Res. 1967;1:89-103.
- Azevedo CS. Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de dentina afetada por cárie. [dissertação (Mestrado em Odontologia)]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2012.
- Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:89-99.
- Belstrom D, Damgaard C, Nielsen CH, Holmstrup P. Does a causal relation between cardiovascular disease and periodontitis exist? Microb Infect. 2012;14:411-8.
- Beg AM, Jones MN, Miller-Torbert T, Holt RG. Binding of Streptococcus mutans to extracellular matrix molecules and fibrinogen. Bioch Biophys Res Comm. 2002;298:75-9.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Car Res*. 2011;45:69-86.

Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, Jenkinson HF. The changing faces of Streptococcus antigen I/II polypeptide family adhesin. *Mol Microbiol*. 2010;77:276-89.

Chia JS, You CM, Hu CY, Chiang BL, Chen JY. Human T-cell responses to the glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:441-5.

Chia JS, Lin YL, Lien HT, Chen JY. Platelet aggregation induced by serotype polysaccharides from *Streptococcus mutans*. *Infection Immun*. 2004;72:2605-17.

Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;272:154-62.

Crowley PJ, Brady LJ, Michalek SM, Bleiweis AS. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. *Infect Immun*. 1999;67:1201-6.

Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem*. 2007;365:208-14.

Delahaye F, Goulet V, Lacassin F, Ecochard R, Selton-Suty C, Hoen B, Etienne J, Briancon S, Leport C. Characteristics of infective endocarditis in France in 1991. A 1 year survey. *Eur Heart J*. 1995;16:394-401.

Drangsholt MT. A new causal model of dental diseases associated with endocarditis. *Ann Periodontol*. 1998;3:184-96.

Dorn BR, Dunn WA, Progulske-Fox A. Invasion of Human Coronary Artery Cells by Periodontal Pathogens. *Infect Immun*. 1999;67:5792-8.

Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;187:139-44.

Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Scholler-Guinard M, Klein JP. Insertional inactivation of pac and rmlB genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect Immun*. 2003;71:5169-77.

Epstein SE, Zhu J, Najafi AH, Burnett MS. Insights into the role of infection in atherosclerosis and in plaque rupture. *Circulation*. 2009;23:3133-41.

Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev*. 2010;8:623-33.
Fontana M, Dunipace AJ, Gregory RL, Noblitt TW, Li Y, Park KK, et al. An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res*. 1996;30(2):112-8.

Ford PJ, Raphael SL, Cullinan MP, Jenkins AJ, West MJ, Seymour GJ. Why should a doctor be interesting in oral disease? *Exprt Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8:1-11.

Fujiwara T, Nakano K, Kawaguchi M, Ooshima T, Sobue S, Kawabata S, Nakagawa I, Hamada S. Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. *Eur J Oral Sci*. 2001;109:330-4.

Gold OG, Jordan HJ, van Houte JV. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 1973;18:1357-64.

Goulet V, Etienne J, Fleurette J, Netter R. L'endocardite infectieuse en France: caractéristiques épidémiologiques. *Presse Méd*. 1986;15:1855-8.

Han TK, Zhang C, Dao ML. Identification and characterization of collagen-binding activity in *Streptococcus mutans* wall-associated protein: A possible implication in dental root caries and endocarditis. *Bioc Biophi Res Comm*. 2006;343:787-92.

Hirasawa M, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Res*. 2003;37:212-7.

Hoen B, Alla F, Beguinot I, Bouvet A, Briancon S, Casalta JP, Danchin N, Delahaye F, Etienne J, Le Moing V, Leport C, Mainardi JL, Ruimy R, Selton-Suty C, Vandernes F. Change profile of infective endocarditis. Results of one year survey in France in 1999. *JAMA*. 2002;208:75-81.

Huck O, Saadi-Thiers K, Tennenbaum H, Davideau JL, Romagna C, Laurent Y, Cottin Y, Roul J. Evaluation of periodontal risk for patient risk of or suffering from artherosclerosis recent biological hypothesis and therapeutic consequences. *Arc Card Disease*. 2011;104:352-8.

Jakubovics NS, Stromberg N, van Dolleweerd CJ, Kelly CG, Jenkinson HF. Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. *Mol Microbiol* 2005;55:1591-605

Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis*. 2010;16:729-39.

Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol.* 1997;23:183–90.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *TRENDS Microbiol.* 2005;13:589-95.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial ecology. In: Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, LeBlanc DJ, editors. *Oral microbiology and immunology.* Washington, D.C: ASM Press; 2006. p. 89-105.

Klemm P, Vejborg M, Hancock V. Prevention of bacterial adhesion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;88:451-9.

Kilian, M. Systemic disease: manifestations of oral bacteria. In: McGlee JR, Michalek SM, Cassel GH, editors. *Dental microbiology.* Philadelphia: Harpers & Row; 1982. p. 822-38.

Koo H et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:782-9.

Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glycosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010;192:3024-32.

Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:17-8.

Lee SF, Progulske-Fox A, Erdos GW, Piacentini DA, Ayakawa GY, Crowley PJ and Bleiweis AS. Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infect Immun.* 1989;57:3306-13.

Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005;7:95-107.

Lemos JA, Lin VK, Nascimento MM, Abranches J, Burne RA. Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol.* 2007;65:1568-81.

Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008;154:3247-55.

Len AC, Harty DW, Jacques NA. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology*. 2004;150:1339-51.

Li X, Kolltveit K M, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Ver*. 2000;13:547-58.

Linzer R, Sreenivasulu M, Reddy M, Levine MJ. Structural Studies of the Serotype-f Polysaccharide Antigen from *Streptococcus mutans* OMZ175. *Infect Immun*. 1987;55:3006-10.

Loo CY, D. A. Corliss DA, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* Biofilm Formation: Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes. *J Bacteriology*. 2000;182:1374-82

March PD, Martin MV. The mouth as a microbial habitat. In: March PD, Martin MV, editors *Oral Microbiology*. 5th ed. China: Churchill Livingstone 2009. p. 8-22.

Marquezan M, Correa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009;54:1111-7.

Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:403-13.

Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr*. 1966(74 Suppl):380.

Moreillon P, Que, YA. Infective endocarditis. *Lancet*. 2004;363:139-49.

Nagata E, Toledo A, Oho T. Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26:78-88.

Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype *k*, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2004;42:198-202.

Nakano K, Fujita K, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of biofilm regulatory proteinA of *Streptococcus mutans* to systemic virulence. *Microb Infect*. 2005;7:1246-55.

Nakano K, Inaba H, Nomura R. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiology*. 2006;44:3313-17.

Nakano K, Hokamura K, Tanigushi N, Wada K, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Nakagawa I, Speziale P, Shimada N, Amano A, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K, Ooshima T. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nature Comm.* 2011;1-10. [cited from 2011 Jul. 01]. Available from <http://www.nature.com/ncomms/journal/v2/n9/pdf/ncomms1491.pdf>

Nemoto H, Nakano K, Nomura R, Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the valve of an infective endocarditis patient. *J Med Microbiol.* 2008;57:891-5.

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* Adherence and Colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73:407-53.

Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Molecular analysis of the genes involved in the biosynthesis of serotype specific polysaccharide in the novel serotype k strains of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:303-9.

Nomura R, Nakano K, Nemoto H. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol.* 2006;55:1135-40.

Nomura R, Nakano K, Tanigushi JL, Nemoto H, Gronroos L, Alaluusua S, Ooshima T. Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol.* 2009;58:469-75.

Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T. Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Mol Microbiol.* 1989; 5:673-8.

Paterick TE, Paterick TJ, Nishimura RA, Steckelberg JM. Complexity and subtlety of infective endocardites. *Mayo Clin Proc.* 2007;82:615-23.

Peirson NS, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nuc Acids Res.* 2003;31:(14)e73.

Pecharki D, Petersen FC, Assev S, Scheie A. Involvement of antigen I/II surface proteins in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:366-71.

Peterson SN, Snesrud E, Schork NJ, Bretz WA. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Int Dent J.* 2011;61:11-22.

Que Y, Moreillon P. Infective endocarditis. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:322-36.

Rölla G, Ciardi JE, Schultz SA. Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite: possible mechanism for sucrose dependent bacterial colonization of teeth. *Scan J Dent Res.* 1983;91:112-7.

Russell MW, Lehner T. Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. *Arch Oral Biol.* 1978;23:7-15.

Santos GS, Penha CL, Mattos-Guaraldi AL, Attias M, Lopes-Bezerra L, Silva-Filho FC, Nagao PE. Group B Streptococcus induces tyrosine phosphorylation of annexin V and glutathione S-transferase in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2009;24:393-9.

Sato Y, Okamoto K, Kagami A, Yamamoto Y, Igarashi T, Kizaki H. *Streptococcus mutans* harboring collagen-binding adhesin. *J Dent Res.* 2004;83:534-9.

Scheie AA, Eggen KH, Rölla G. Glucosyltransferase activity in human in vivo formed enamel pellicle and in whole saliva. *Scan J Dent Res.* 1987;95:121-5

Schiling KM, Bowen, WH. The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1988;67:2-8.

Senadheera MD, Andrew W. C. Lee AWC, David C. I. Hung DCI, Grace A. Spatafora GA, Goodman SD, Cvitkovitch DG. The *Streptococcus mutans* *vicX* Gene Product Modulates gtfB/C Expression, Biofilm Formation, Genetic Competence, and Oxidative Stress Tolerance. *J Bacteriol.* 2007;189:1451-8.

Sheng J, Marquis RE. Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;262:93-8.

Shibata Y, Ozaki K, Seki M, Kawato T, Tanaka H, Nakano Y, Yamashita Y. Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4107-12.

Shun CT, Lu SY, Yeh CY, Chiang CP, Chia JS, Chen JY. Glucosyltransferases of viridans streptococci are modulins of interleukin-6 induction in infective endocarditis. *Infect Immun.* 2005;73:3261-70.

Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Prot Res*. 2007;6:2152-60.

Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Munter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. *Plos One*. 2010;5:e13135. [cited from 2012 Sep 05]. Available from: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0013135>

Tymchenko N, Nilebäck E, Voinova MV, Gold J, Kasemo B, Svedhem S. Reversible changes in cell morphology due to cytoskeletal rearrangements measure in real-time by QCM-D. *Biointerphases*. 2012;1-9. [cited from 2012 Agu. 15]. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s13758-012-0043-9?null>

van der Meer JT, van Vianen W, Hu E, van Leeuwen WB, Valkenburg H A, Thompson, J, Michel MF. Distributions antibiotic susceptibility and tolerance of bacterial isolates in culture positive cases of endocarditis in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10:728-34.

Vernier-Georgenthum A, al-Okla S, Gourieux B, Klein JP, Wachsmann D.. Protein I/II of oral viridans streptococci increases expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils in vitro. *Cell Immunol*. 1998;187,145-50.

Zeituni AE, Carrion J, Cutler CW. *Porphyromonas gingivalis*-dendritic cell interactions: consequences for coronary artery disease. *J Oral Microbiol*. 2010;2:5782-9.

Waterhouse JC, Russel RRB. Dispensable genes and foreign DNA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2006;152:1777-88.

Wen ZT, Burne RA. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *App Env Microbiol*. 2002;68:1196-203.

Wen ZT, Baker HV, Burne RA. Influence of BrpA on Critical Virulence Attributes of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2006;188:2983-92.

Wilson WR, Karchmer AW, Dajani AS, Taubert K A, Bayer A, Kaye D, Bisno AL, Ferrieri, P, Shulman ST, Durack DT. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to Streptococci, enterococci, staphylococci and HACEC microorganisms. *JAMA*. 1995;274:1176-1.

APÊNDICE A - Termo de consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: **Expressão gênica de isolados clínicos de *Streptococcus mutans* durante a invasão às células epiteliais**

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (inserir o nome, profissão), residente e domiciliado na _____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "**Expressão gênica de isolados clínicos de *Streptococcus mutans* durante a invasão às células epiteliais**". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente de que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possa investigar a relação entre doenças infecciosas orais e doenças sistêmicas. Este conhecimento poderá trazer benefícios para a prevenção de doenças cardíacas provocadas por infecções orais.
- II) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o meu tratamento; não vão me curar; não vão me causar nenhum problema.
- III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário (prejuízo financeiro) com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo.

- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação ou justificativa.
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não irá interferir no atendimento ou tratamento médico.
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.
- VII) Entendo que minha participação é voluntária e não serei recompensado financeiramente por ela.
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 2009

() Paciente/() Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: CD Luciana Kfourir Siriani
Pós-graduanda do Depto. de Microbiologia
ICB/USP **Telefone para contato: 11 3091-7201**

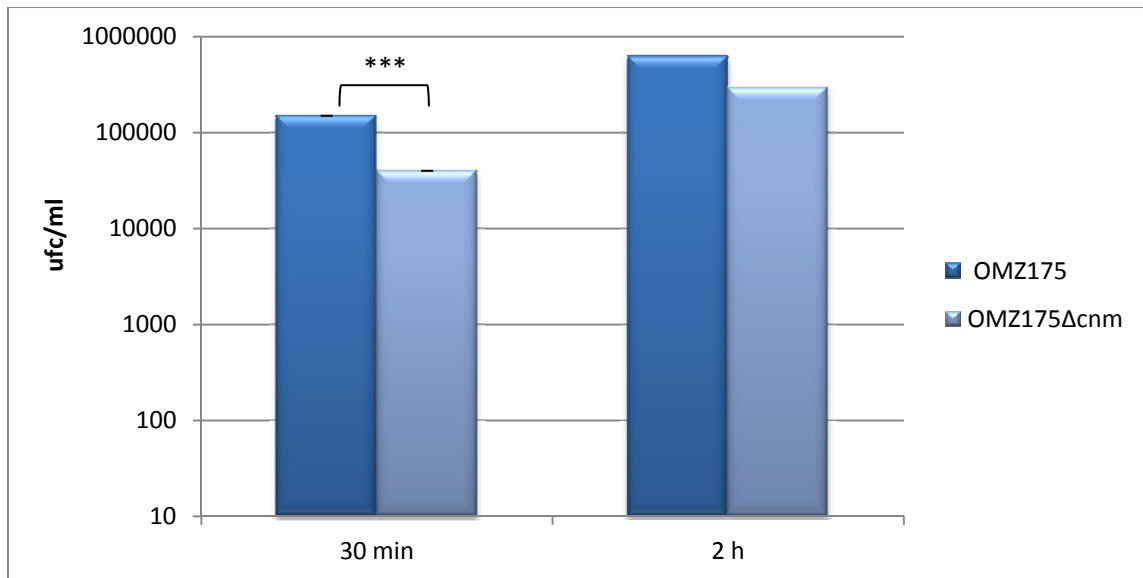
Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato
Departamento de Microbiologia – ICB/USP
Telefone para contato: 11 3091-7201

APÊNDICE B - Caracterização dos isolados clínicos de *Streptococcus mutans*: identificação, tipagem e presença do gene *cnm*

Adultos	Amostras	Sorotipo	Presença do gene <i>cnm</i>
1	1-16; 1-21	c	Negativo
2	2-21; 2-22; 2-24	c	Negativo
3	3-1; 3-3; 3-5; 3-6; 3-8; 3-9; 3-11; 3-14; 3-15; 3-18; 3-19; 3-21; 3-1L; 3-2L; 3-3L; 3-4L; 3-5L	c	Negativo
4	4-1L; 4-2L; 4-3L; 4-4L; 4-5L	c	Negativo
5	5-1L	c	Negativo
6	6-1; 6-2; 6-3; 6-4; 6-5	k	Positivo
7	7-1; 7-2; 7-3	c	Negativo
11	11-1; 11-3	c	Negativo
12	12-1	c	Negativo
13	13-1; 13-2; 13-3; 13-7; 13-8; 13-9; 13-10	c	Negativo
14	14-1; 14-2	c	Negativo
15	15-1; 15-2	c	Negativo
16	16-1; 16-2; 16-4; 16-5; 16-6; 16-9; 16-12; 16-13; 16-15; 16-19; 16-20; 16-21	c	Negativo
18	18-1; 18-2; 18-4; 18-5; 18-6; 18-7; 18-8; 18-9; 18-10; 18-11	c	Negativo
19	19-2; 19-3; 19-4; 19-5; 19-6; 19-7; 19-9;	c	Negativo
20	20-3; 20-4; 20-9; 20-11; 20-12; 20-16	c	Negativo
22	22-1; 22-2; 22-1L; 22-2L; 22-3L	c	Negativo
30	30-2L; 30-3L	c	Negativo
31	31-1; 32-2; 31-3; 31-1L; 31-2L	c	Negativo
Crianças livres de cárie	Amostras	Sorotipo	Presença do gene <i>cnm</i>
1	S2A1	c	negativo
2	S3A3	c	negativo
3	S4A2; S4A3; S4B8	c	negativo
4	S5A1; S5A3; S5C3	c	negativo
5	S8A2; S8C3	c	negativo
6	S22A2; S22A4	c	negativo
7	S25A3; S25C3	c	negativo
8	A1	c	negativo
9	B1	c	negativo
Crianças cárie ativas	Amostras	Sorotipo	Presença do gene <i>cnm</i>
1	C2A3 C2A4	c e	negativo positivo
2	C5A1	c	negativo
3	C6A1; C6D2	c	negativo
4	C7A3; C7A4	c	negativo
5	C9A1; C9A3; C9D2	c	negativo
6	C10A1; C10A4; C10B6; C10C1; C10C2	c	negativo
7	C13A1; C13A2; C13B1; C13B2	c	negativo
8	C16A1	c	negativo
9	C17A1	c	negativo
10	C18A1	c	negativo
11	T1/100	c	negativo
12	T23	c	negativo
13	T12/A21	c	negativo
14	T567	c	negativo
15	T184	c	negativo
16	T5A4	c	negativo
17	T9C22	c	negativo
18	T366	c	negativo
19	T1A21	c	negativo

APÊNDICE C - Avaliação de *S. mutans* na interação celular utilizando o inóculo em fase estacionária

Figura C.1 - Avaliação de *S. mutans* OMZ175 e OMZ175 Δ cnm (ufc/ml) após 30 minutos e 2 horas de interação com HCAEC utilizando inóculo em fase estacionária



*** $p < 0,001$