

**ROBERTO NEPOMUCENO DE SOUZA LIMA**

**ANÁLISE DO PAPEL DOS TRANSPORTADORES ABC DE OLIGOPEPTÍDEOS,  
POLIAMINAS, FOSTATO INORGÂNICO, GLUTAMATO E GLUTAMINA NA  
FISIOLOGIA E PATOGÊNESE DE BACTÉRIAS DO TRATO GASTRO-  
INTESTINAL**

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Café Ferreira

Versão original

## RESUMO

NEPOMUCENO, R. S. L. **Análise do papel dos transportadores ABC de oligopeptídeos, poliaminas, fosfato inorgânico, glutamato e glutamina na fisiologia e patogênese de bactérias do trato gastro-intestinal.** 2013. 204 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A captação de nutrientes é um fator essencial para a sobrevivência de qualquer organismo. Entre as bactérias esses sistemas são classificados como transportadores passivos e ativos. Os transportadores ativos apresentam especial relevância por serem associados com a internalização de compostos com menor concentração extracelular e, portanto mais difíceis de serem captados. O grupo de transportadores ativos mais prevalentes pertencem a família de transportadores ABC, os quais utilizam a energia gerada pela clivagem do ATP para promover alterações estruturais nas proteínas que o compõe e permitir a passagem da substância pela membrana citoplasmática. Esses transportadores são responsáveis pela intermediação da obtenção dos mais diversos nutrientes lipídicos, protéicos, açúcares, entre outros. Neste trabalho destacamos o papel de cinco sistemas de transporte ABC relacionados a captação de oligopeptídeos (Opp), poliaminas (Pot), fosfato inorgânico (Pst), glutamato (Gln) e glutamina (Glm). Estes sistemas são representados por três domínios funcionais, o domínio ligador de nucleotídeos, o domínio integral de membrana, e o domínio ligador de substrato, componente responsável pela especificidade e afinidade do sistema de captação. Neste trabalho, utilizando protocolos de mutagênese sítio-dirigida, os sistemas de transporte, ou alguns de seus componentes foram deletados, em duas bactérias representantes do trato gastro-intestinal, o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), agente etiológico da cárie dental, e a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), bactéria capaz de colonizar o intestino de mamíferos. A inativação do sistema Opp, de *S. mutans* não alterou a capacidade de crescimento ou de biossíntese de biofilme, responsável por sua virulência. Do mesmo modo, a inativação do sistema Pot, não interferiu no crescimento bacteriano em meio rico, porém aumentou a capacidade desta bactéria sobreviver em presença de um ambiente ácido, fator essencial para o desenvolvimento da cárie dental. Já o mutante no domínio ligador de substrato do sistema Pst, reduziu a capacidade desta bactéria produzir biofilme, bem como aumentou a resistência à ambientes ácidos. Com relação aos sistemas de transporte Gln e Glm, foram observadas alterações nos tempos de geração e na capacidade de *S. mutans* aderir à superfícies abióticas e produzir biofilmes. Por fim, mutantes na proteína OppA, o domínio ligador de substrato, do sistema de transporte Opp de *E. coli* enterohemorrágica não modificaram a capacidade de essa bactéria produzir e secretar a toxina Stx, bem como não alteraram a expressão da adesina intimina, ou sua capacidade de lesionar células eucarióticas ou camundongos Balb/c. Esse trabalho demonstra que apesar dos transportadores estudados pertencerem a um mesmo grupo (transportadores ABC), os papéis envolvidos na fisiologia e patogenicidade, dependem do nutriente a ser transportado bem como do modelo biológico a ser estudado. Esse trabalho contribui na busca de desvendar o papel desses transportadores ativos em bactérias do trato gastro-intestinal.

Palavras-chave: Transportadores ABC. Oligopeptídeos. Poliaminas. Fosfato Inorgânico. Glutamato. Glutamina. *Streptococcus mutans*. *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

NEPOMUCENO, R. S. L. **Analysis of the role of ABC transporters of oligopeptides, polyamines, inorganic phosphate, glutamate and glutamine in the physiology and pathogenesis of gastro-intestinal tract bacteria.** 2013. 204 p. Ph. D. thesis (Pathogen-Host Biology Relation) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The uptake of nutrients is an essential trait for the survival of any cell. Among bacteria, nutrient transport systems are classified as passive or active carriers, regarding the energy requirement. Active transporters are associated with the uptake of compounds frequently available at low extracellular concentrations and encompass transporters of the ABC (ATP-binding cassette) family, which requires the energy generated by the cleavage of ATP to promote the uptake of substances, such as lipids, amino acids, and sugars, through the cytoplasmic membrane. This study highlighted the role of five ABC transport systems involved with the uptake of oligopeptides, polyamines, inorganic phosphate, glutamate and glutamine. The ABC transporters are formed by three functional domains: the nucleotide-binding domain, the membrane domain (permease) and the substrate-binding domain which is responsible for specificity and affinity of the system to different molecules. In this work, using site-directed mutagenesis methods, we deleted the genes encoding the substrate-binding domains of different transport systems of two bacterial species living at different human gastro-intestinal tract niches: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), the etiological agent of dental caries, and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), capable to cause diarrhea and the hemolytic uremic syndrome in humans. The inactivation of the *S. mutans* oligopeptide transport system, Opp, did not change the bacterial growth and ability to bind abiotic surfaces. Inactivation of the polyamine uptake system did not interfere with growth in rich medium, but increased the survival of bacteria in acid environments, which is essential for the development of dental caries. In contrast, inactivation of the inorganic phosphate transport system reduced the ability of *S. mutans* to adhere to abiotic surfaces and enhanced to resistance to acid conditions. Regarding the glutamate and glutamine transport systems, the *S. mutans* mutants showed changes in growth rates and adhesion to abiotic surfaces. Inactivation of the OppA protein, the substrate-binding domain of the EHEC Opp system, did not affect the production and secretion of the Stx toxin and intimin neither affected the in vitro and vivo pathogenicity of the strain. Collectively, the present study shows that the roles of ABC transporters in the physiology and pathogenicity of bacteria may vary according to the species involved as well as the substrate transported.

Keywords: ABC transporters. Oligopeptides. Polyamines. Inorganic Phosphate. Glutamate. Glutamine. *Streptococcus mutans*. *Escherichia coli*.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Transportadores ABC

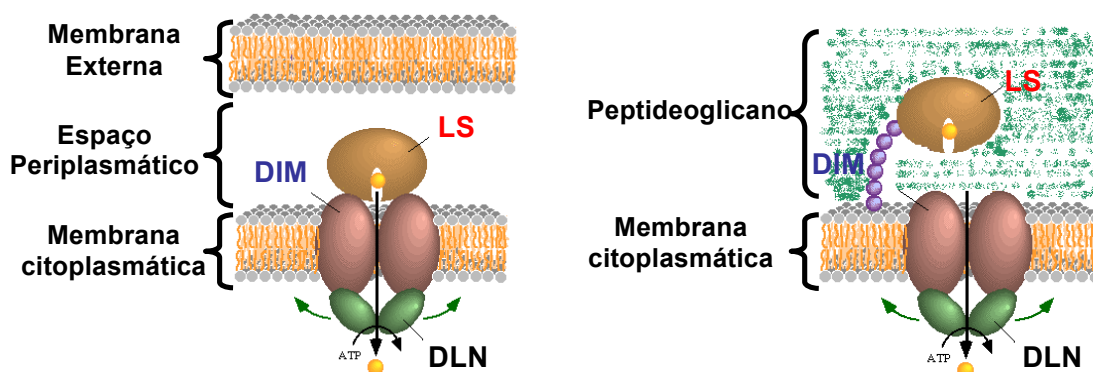
A nutrição bacteriana depende da presença e capacidade de uma bactéria reconhecer e transportar nutrientes essenciais para sua sobrevivência, o que ocorre por dois processos distintos: a difusão passiva/facilitada, ou ainda, mecanismos de transporte ativo. Sistemas de transporte ativo de nutrientes em bactérias podem ser divididos em dois grupos: os sistemas primários, sensíveis ao choque osmótico cuja fonte de energia vem diretamente da hidrólise de ATP, e os sistemas secundários, insensíveis ao choque osmótico, que utilizam o gradiente eletroquímico da membrana para extrair a energia necessária para o seu funcionamento (BERGER, 1973).

Entre os sistemas primários de transporte destacam-se os sistemas do tipo ABC (*ATP Binding Cassete*), sistemas ubiqüitários presentes em arqueias, eubactérias e eucariotos, sendo codificados por 5 a 15% dos genes presentes no genoma de bactérias (DASSA et al., 2001). Os transportadores ABC são associados à captação e exportação de diferentes substâncias, incluindo metais, polímeros, açúcares e oligopeptídeos. Como característica primordial, esses transportadores são compostos por três domínios funcionais, o domínio integral de membrana (DIM), o domínio ligador de nucleotídeos (DLN) e o domínio ligador de substrato (LS), este último presente apenas nos sistemas de captação, também conhecidos como importadores, exclusivos de arqueias e eubactérias (Figura 1) (HIGGINS, 1992, 2001). DIM é responsável pela formação de um poro na membrana citoplasmática, por onde o soluto a ser transportado irá transitar e é composto por uma a duas proteínas, já o DLN é o componente responsável pela hidrólise do ATP e fornecimento de energia para o sistema, também podendo apresentar de uma a duas proteínas associadas à face interna da membrana citoplasmática. O LS é o componente responsável pelo reconhecimento do soluto e seu direcionamento para os demais componentes do transportador, responsável tanto pela afinidade quanto pela especificidade do sistema.

Entre os domínios dos sistemas de transporte ABC, o domínio LS se encontra solúvel no periplasma de bactérias gram-negativas, enquanto que em bactérias gram-positivas se apresenta na forma de lipoproteínas ancoradas por meio de uma

acil-gliceril-cisteína N-terminal à face externa da membrana citoplasmática e são pouco conservados, uma vez que são capazes de internalizar diferentes solutos. Já o DLN é o mais conservado, onde encontramos sequências de aminoácidos conhecidas como motivos WalkerA e WalkerB, relacionados à capacidade hidrolisadora, entre os quais se o motivo de assinatura LSGGQ, também conhecido como peptídeo de ligação (DASSA et al., 2001; MOUTRAN et al., 2004).

**Figura 1- Sistema de transporte ABC**



Representação esquemática de um transportador ABC em bactéria gram-negativa, à esquerda e gram-positiva, à direita.

Os sistemas de transporte ABC presentes nas bactérias refletem tanto o estilo de vida do microrganismo como podem influenciar na expressão de fatores associados à virulência de espécies patogênicas ao homem sendo capazes de incorporar uma grande variedade de substâncias, desde oligopeptídeos complexos a íons como magnésio (HIGGINS, 1992, 2001). Para tal, o modo de avaliação considerado padrão-ouro do papel fisiológico dos sistemas de transporte de nutrientes baseia-se no emprego de moléculas radioativamente marcadas, quando disponíveis, no qual é possível mensurar a incorporação destas, bem como avaliar as características bioquímicas do sistema de transporte (KRASTEL et al., 2010; RAKSAJIT et al., 2006).

## 1.2 Sistema de transporte de oligopeptídeos Opp

Em bactérias, um dos solutos captados por transportadores ABC são os oligopeptídeos, nutrientes que são internalizados pelo sistema Opp encontrado

amplamente distribuído entre as bactérias e responsável pela incorporação de cadeias contendo de 2 a 18 aminoácidos (MONNET, 2003). A caracterização desse sistema, com relação a sua funcionalidade e composição é baseada em estudos focados em diversos organismos gram-negativos e gram-positivos, como *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (ACOSTA et al., 2005; AMES et al., 1973; NAIDER et al., 1975; NAKAMATSU et al., 2007; RUDNER et al., 1991).

Os componentes desse transportador são distribuídos entre as proteínas OppB e OppC, responsáveis pela formação do domínio integral de membrana, as proteínas OppD e OppF que codificam o domínio ligador de nucleotídeos e a proteína OppA, ou domínio ligador de substrato, que confere a afinidade e especificidade do sistema (KLEPSCH et al., 2011) (Figura 2). Uma característica marcante deste transportador que o diferencia da maioria dos transportadores ABC é a capacidade de reconhecer e transportar os mais diversos oligopeptídeos, com grande variação de sequência de aminoácidos que os compõe. Essa característica é fornecida pela proteína OppA que promove a grande afinidade, porém baixa especificidade do sistema.

Além da captação de oligopeptídeos ser um fator importante para a sobrevivência, seu papel fisiológico pode ser estendido, como observado em *E. coli* e *S. Typhimurium*, nas quais esse sistema é responsável pela reciclagem de até 50% da peptidoglicana da parede celular bacteriana (GOODELL et al., 1987; PARK et al., 1998). Em diversas bactérias gram-positivas, como *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae*, a capacidade de transformação se deve a respostas a comunicações intercelulares dependentes de peptídeos e que só ocorrem na presença de um sistema de captação de oligopeptídeos funcional, incluindo no mínimo um ortólogo de OppA (ALLOING et al., 1998; PEARCE et al., 1994; RUDNER et al., 1991). Além disso, diversos estudos têm estabelecido uma conexão entre fatores associados à virulência bacteriana e a expressão de um ortólogo funcional da proteína OppA, como observado para *Listeria monocytogenes*. Mutantes deficientes na expressão dessa proteína reduziram a capacidade dessa bactéria sobreviver à fagocitose por macrófagos, bem como diminuiu a taxa de replicação bacteriana em órgãos de camundongos infectados pela cepa mutante em comparação com a selvagem (BOREZEE et al., 2000).

Um papel do sistema de transporte Opp, descrito na literatura, sobre a virulência bacteriana está vinculado com a capacidade de este afetar a produção de

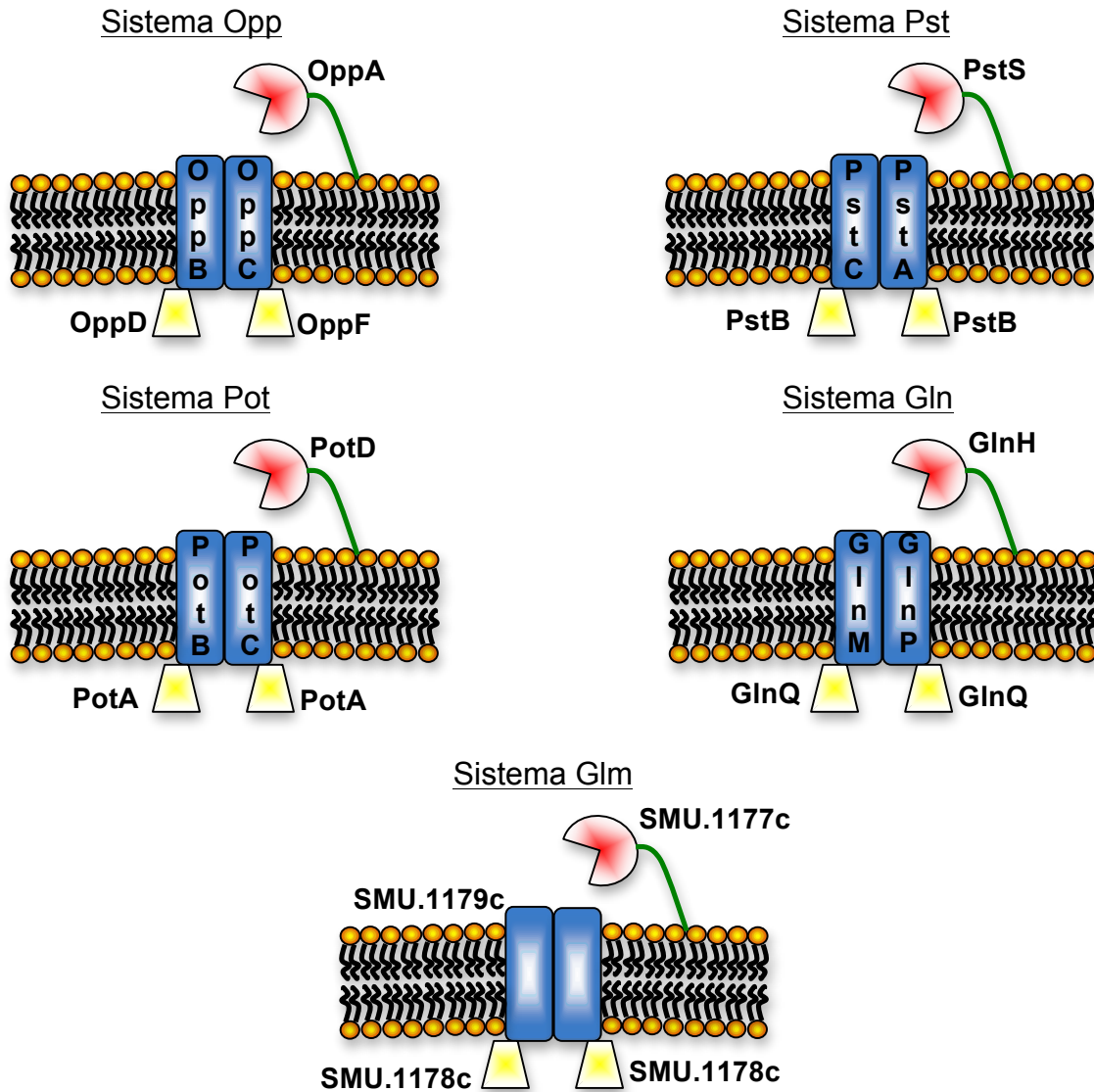
biofilme. Em *Vibrio fluvialis* a deleção do gene *oppA* foi capaz de aumentar em até duas vezes a produção de biofilme em meio mínimo de cultura na presença de peptona ou triptona (LEE et al., 2004). No entanto, os estudos que apresentaram um destaque maior na capacidade do sistema Opp interferir diretamente na adesão e patogenicidade *in vivo* foram realizados em *Streptococcus*, que apresentam também particularidades na organização genética do operon que codifica esse sistema, conforme apresentado no artigo submetido à revista *Microbiologia in foco*, em anexo.

### 1.3 Sistema de transporte de poliaminas Pot

Poliaminas são compostos essenciais para o crescimento e sobrevivência, representados por moléculas policatiônicas, ubíquitas que interagem com ácidos nucléicos e, conseqüentemente, possuem um papel significativo na replicação de DNA e nos processos de transcrição e tradução (CHILDS et al., 2003). Seus principais constituintes englobam a putrescina, esperidina, espermina e cadaverina. O conteúdo intracelular destes compostos são regulados tanto pelos métodos de síntese quanto pelos sistemas de captação. O processo de síntese envolve diversas enzimas e precursores, como L-arginina e L-metionina (TABOR et al., 1985). Dentre as enzimas envolvidas na biossíntese, destaca-se a presença da ornitina-decarboxilase, reponsável pela transformação da L-ornitina em diaminobutano, o que representa um passo inicial essencial para a síntese de putrescina e espermidina. A ação dessa enzima pode ser inibida por uma ligação forte com a molécula de DFMO (difluorometilornitina), o que facilita o estudo do papel real dos sistemas de captação (METCALF et al., 1978).

O sistema de captação de poliaminas é codificado por quatro genes organizados em um operon policistrônico (*potA*, *B*, *C* e *D*) que codificam um sistema de transporte ativo do tipo ABC. A presença desse sistema é necessária para o crescimento celular normal *in vitro* (KASHIWAGI et al., 1996) (Figura 2).

**Figura 2 - Sistemas de transporte ABC estudados**



Representação esquemática dos cinco transportadores ABC estudados no presente trabalho, em bactéria gram-positivas.

Apesar do papel essencial para o crescimento ótimo microbiano, o excesso de poliaminas intracelulares está associado à inibição do crescimento (YOHANNES et al., 2005). De fato, o balanço tênue dado pela relação biossíntese-transporte versus degradação-secreção é essencial para definir o papel que as poliaminas terão sobre a célula (TABOR et al., 1985). Quando essas se apresentam em alta concentração acabam por inibir a expressão gênica global, já em baixas concentrações possui papel inverso. Outro aspecto relacionado à presença de poliaminas está na sua correlação direta à concentração dessas e a resposta a estresse. Nestas condições há um estímulo para produção dessas moléculas, que



inibem a expressão geral bacteriana, porém estimulam a transcrição de genes relacionados à proteção ao estresse (RHEE et al., 2007).

Em *Streptococcus pneumoniae* foram identificados os genes *pot*, voltados para captação de espermidina. Análise *in silico* indicou que os genes estão organizados em um operon, no qual não há a presença de um promotor óbvio imediatamente acima do gene *potA* (WARE et al., 2005). A utilização da técnica de RT-PCR indicou a presença de um RNAm policistrônico de organização não usual, demonstrando, além da presença dos quatro genes envolvidos no sistema de captação de poliaminas, o gene *murB*, envolvido da síntese de peptidoglicanos, e que se encontra imediatamente acima do gene *potA*. Um mutante deletado no gene *potD* foi obtido e a ausência da proteína PotD não alterou a cinética de crescimento em comparação à cepa selvagem em diversos meios ricos testados, no entanto a adição de inibidores de síntese de poliaminas afetaram de forma considerável a capacidade de crescimento celular, porém sem a eliminação completa do crescimento, indicando que o mutante possivelmente possui outro mecanismo de obtenção de poliaminas independente do sistema Pot. Esse dado foi reforçado pela observação de que, mesmo na presença do inibidor de síntese, a adição de poliaminas extracelulares permitiu o crescimento da cepa selvagem no mesmo nível do encontrado na ausência desse inibidor (WARE et al., 2006).

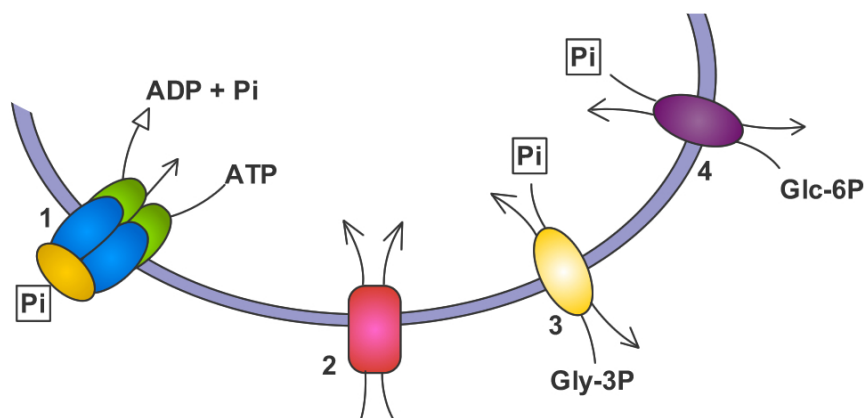
#### **1.4 Sistema de transporte de fosfato inorgânico Pst**

O transporte de fosfato inorgânico (Pi), em conjunto com o transporte de componentes organo-fosfatados, são essenciais para o controle e regulação interna da homeostase do fósforo, relacionado à fontes de energia, biossíntese de DNA, RNA e fofolípídeos (VAN VEEN et al., 1993).

O modelo biológico no qual o transporte de fosfato inorgânico foi melhor estudado é a bactéria *Escherichia coli* na qual são conhecidos quatro sistemas de transporte de fosfato que podem ser classificados com base na especificidade ao substrato, bioenergética e critérios estruturais (VAN VEEN, 1997). O sistema Pst e o sistema Pit são específicos para fosfato inorgânico e são controlados pela sua concentração no ambiente. Há também dois sistemas de transporte de fosfato inorgânico mediados por troca iônica, onde o fosfato inorgânico é aceito como um análogo de um organo-fosfato, como os sistemas que transportam *sn*-glicerol-3-

fosfato (GlpT) e o transportador de Glicose-6-fosfato (UhpT) (Figura 3) (LARSON, 1987; MALONEY et al., 1990).

**Figura 3** – Sistemas de transporte de fosfato de *E. coli*



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

Fonte: Adaptado de Luz, 2010.

O sistema Pst pertence a grande família dos transportadores ABC, e se caracteriza por possuir uma alta afinidade ao fosfato inorgânico (HIGGINS et al., 1992).

A caracterização desse transportador em *E. coli* mostrou que este é codificado por um operon policistrônico contendo cinco genes, sendo que quatro codificam os componentes estruturais do sistema de transporte. O primeiro cístron consiste no gene *pstS* e codifica a proteína ligadora de fosfato, caracterizada pela alta afinidade e especificidade a este íon. À jusante são encontrados os genes *pstA* e *pstC*, que codificam proteínas hidrofóbicas com seis hélices transmembrânicas e são responsáveis pela formação do poro pelo qual o fosfato passa após ser ligado por PstS (BRANDL et al., 1986; WEBB et al., 1992). PstB, codificado pelo cístrons subsequente *pstB*, consiste na proteína ligadora de nucleotídeo, pois possui os motivos de ligação ao ATP (Walker A e Walker B). PstB interage com PstA e/ou PstC na sua face citoplasmática, e por analogia a outros sistemas ABC transportadores, provavelmente funciona como um dímero (WANNER, 1993) (Figura 2). O último cístron do operon, *phoU*, codifica uma proteína periférica de membrana,

e seu papel no transporte de fosfato ainda é controverso, embora estudos sugiram que esta proteína tenha um papel na regulação do sistema (BUCKLES et al., 2006).

O operon *pst* é parte do regulon Pho, um regulon celular global, que consiste em aproximadamente 33 genes, cujos produtos agem primariamente na assimilação de fosfato do ambiente (WANNER, 1993). O regulon Pho é representado por um sistema de dois componentes sendo uma proteína sensora (PhoB) e uma proteína reguladora transcricional (PhoR) que na carência de fosfato ativa a transcrição dos genes pertencentes ao regulon, através de sua ligação à sequências específicas, denominadas *Pho boxes*, localizadas nas regiões promotoras dos genes induzíveis pelo regulador (NOVAK et al., 1999; WANNER, 1995). Estudos sugerem que o sistema Pst está ligado a mecanismos moleculares que levam a desativação do regulon Pho, interferindo na expressão dos genes ligados a ele (LAMARCHE et al., 2008; RAO et al., 1990; WANNER, 1996).

Além do papel primordial na incorporação de Pi em condições de escassez, o sistema Pst de transporte está relacionado a mecanismos de virulência em diversos patógenos (LAMARCHE et al., 2008). De fato, segundo Jacobsen et al. (2008), mutantes *pstA* e *pstS* mostraram constutividade na expressão de genes do regulon Pho, demonstrando o papel repressor do operon *pst* sobre esse regulon. Efeitos pleiotrópicos do operon *pst* foram demonstrados em várias linhagens de *E. coli* patogênicas. Na linhagem aviária patogênica, a inativação do sistema Pst reduziu significativamente o número de lesões extra-intestinais nas aves, além da perda de resistência ao soro de coelho e ao choque ácido. Em enteropatogênica de porcos, mutantes *pst* tiveram adesão aos enterócitos e patogenicidade significativamente menor quando comparada à linhagem selvagem (BATISSON et al., 2003; DAIGLE et al., 1995; LAMARCHE et al., 2005). Já em linhagem extraintestinal, mutantes *pst* tiveram uma perda na produção de polissacarídeos de superfície e tornaram-se totalmente não patogênicas. Ao contrário de outras linhagens, uma inserção entre os genes *pstA* e *pstB*, em *E. coli* enteroinvasiva aumentou cerca de cinco vezes o nível de invasão à células epiteliais humanas *in vitro*, tornando a bactéria “hiper-invasiva”, mostrando que deleções neste sistema também pode resultar em aumento da virulência, e não somente em deficiência (SINAI et al., 1993).

Dentro do gênero *Streptococcus*, foi observado que a mutação no gene *pstB* resultou na redução da capacidade de captar fosfato, na frequência de transformação e na patogenicidade em modelo de septicemia em murinos (NOVAK

et al., 1999; POLISSI et al., 1998). Em *S. pneumoniae*, a inativação do gene *pstS* levou a um aumento de duas vezes na susceptibilidade à penicilina nas linhagens estudadas. Além disso, mutação no gene *pstB* mostrou diminuição tanto na competência quanto na capacidade de produzir biofilme, prejudicando a adesão do pneumococo ao epitélio respiratório (SOUALHINE et al., 2005).

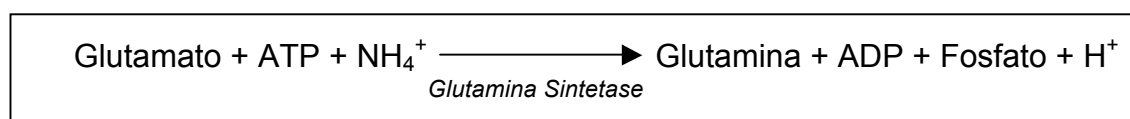
### 1.5 Sistema de transporte de glutamina (Gln) e de glutamato (Gln)

Nos sistemas de transporte ABC outro nutriente que merece destaque é a glutamina, pelo seu papel essencial e a inter-relação bioquímica que possui em conjunto com o glutamato (Figura 4). Esses aminoácidos são importantes como fonte de nitrogênio e necessários para o crescimento em condições limitantes de amônia. Conseqüentemente são importantes para síntese de outros aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares aminados e muitas outras moléculas biologicamente importantes (SMITH, 1990).

A glutamina é a amida do ácido glutâmico (glutamato) e representa um verdadeiro sensor de disponibilidade de nitrogênio extracelular, já que sua concentração diminui na limitação desse, além de modular a taxa de replicação celular. Por outro lado, a concentração intracelular de glutamato responde a variações de osmolaridade do meio e representa o principal grupamento aniônico responsável pela manutenção dos níveis de  $K^+$  no interior das células.

O glutamato é o ânion livre mais abundante em *Escherichia coli* (YAN, 2007). Outro exemplo claro da importância desses aminoácidos se dá pela observação da constituição da camada de peptidoglicano, parte essencial para a sobrevivência de grande parte das eubactérias, no qual observamos a presença do aminoácido D-ácido glutâmico como parte da cadeia lateral polipeptídica (KIM et al., 2007).

**Figura 4** – Relação química entre glutamina e glutamato



Reação de síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia pela enzima *glutamina sintetase*.

Em *E. coli* K12, a captação de glutamato envolve um sistema ativo do tipo ABC, conhecido como Glt, formado pelos genes *gltB*, *gltD* e *gltF* (CASTAÑO et al., 1988). Além do sistema específico de captação de glutamato, observamos em *E. coli* a presença de um segundo operon associado com o transporte de glutamina, que se constitui num dos mais estudados sistemas de transporte dependentes de proteína ligadora pertencente a família ABC de transportadores ativos e constituído por uma proteína ligadora de glutamina (GlnBP) e duas proteínas associadas à membrana citoplasmática (SHEN et al., 1989).

Em bactérias gram-positivas, especificamente as do gênero *Streptococcus* não observamos a presença de dois transportadores ativos específicos (um para glutamato e um para glutamina). De fato, apenas um transportador ativo é responsável pela captação de ambos os aminoácidos, como observado em *S. lactis* e o *S. cremoris* (POOLMAN et al., 1987). Em outro gênero da mesma espécie, o *S. bovis*, verifica-se a ausência do transporte ou utilização do glutamato como fonte de nitrogênio, havendo incorporação de glutamina por mecanismos de transporte ativo (CHEN et al., 1989). Além do papel observado na captação dos aminoácidos, foi verificado em estreptococos do grupo B causadores de sepse e meningite em neonatais, que o sistema de captação de glutamina está diretamente relacionado à patogenicidade bacteriana, como representado pelo requerimento do gene *glnQ* na aderência às células epiteliais mediada pela fibronectina (TAMURA et al., 2002).

Em relação ao *S. mutans*, estudos dos transportadores ABC restringem-se a transportadores de açúcar, metais, oligopeptídeos e aminoácidos (DASHPER et al., 1995; FRANCESCA et al., 2004; NEPOMUCENO et al., 2007; TAO et al., 1993a). Em particular, a captação de glutamina nessa espécie está diretamente relacionada ao valor de pH intracelular e é estimulada pela presença de íons potássio (DASHPER et al., 1995; NOJI et al., 1988; SATO et al., 1989). Estudo recente que buscou esclarecer os aspectos moleculares do transporte desse aminoácido em *S. mutans* e seu papel na fisiologia bacteriana, focou na análise do sistema codificado pelo operon *gln*, predito como o transportador responsável pela captação de glutamina (AJDIC et al., 2002; KRASTEL et al., 2010). Os dados obtidos demonstraram que, diferentemente da predição *in silico*, esse operon codifica um sistema de transporte ativo específico para captação de glutamato. Outro ponto abordado no trabalho demonstrou a correlação entre o sistema que de fato capta

glutamato e a resposta de tolerância ao ácido, reforçando a importância global desses aminoácidos aromáticos na fisiologia bacteriana.

A publicação do trabalho de Krastel et al. (2010) sobre o sistema de captação de glutamato de *S. mutans* UA159, modificou a proposição inicial desse estudo, que estava focado no estudo do operon *gln* que, uma vez inicialmente caracterizado, nos levou a buscar outros possíveis transportadores que desempenhassem a função de captação de glutamina por esta linhagem. A busca por parálogos aos genes constituintes do operon *gln* indicou a presença de um segundo operon, formado pelos genes *smu. 1177c*, *smu. 1178c* e *smu.1179c* (Figura 2). Para tal obtivemos um mutante deficiente nos genes supracitados de forma a demonstrar seu envolvimento na captação de glutamina e expressão de características relacionadas à virulência em *S. mutans*.

## 1.6 Trato gastro-intestinal

O trato gastro-intestinal (TGI), que inicia na cavidade oral e termina no reto, é uma porção do sistema digestivo humano altamente complexo e colonizado por diferentes gêneros bacterianos que habitam superfícies epiteliais distintas. Ao longo de sua extensão, diferentes forças seletivas, como variações de pH, a presença de compostos antimicrobianos e disponibilidade de nutrientes, favorecem ou restringem a permanência e proliferação de espécies bacterianas específicas (REID et al., 2011).

A porção inicial do TGI, representado pela cavidade oral, é um ambiente com alta complexidade microbiana, com a presença de mais de 500 espécies diferentes de bactérias, dentre as quais encontramos o principal agente causal da cárie dental, *Streptococcus mutans* (BEIGHTON, 2005). Nesta região a presença de nutrientes está diretamente relacionada à ingestão dos alimentos pelo hospedeiro e esses são em geral compostos complexos, já que a sua digestão é apenas superficial e iniciada pelos componentes salivares. Com relação as bactérias que colonizam a porção distal do TGI encontramos as enterobactérias, dentre as quais destacamos as *Escherichia coli*, uma espécie bacteriana que normalmente não causa danos ao hospedeiro, porém algumas linhagens específicas, que adquiriram fatores de virulência, são capazes de causar doenças. Além disso, mesmo linhagens não patogênicas podem causar infecções quando o hospedeiro está debilitado ou

imunodeprimido, ou ainda, quando barreiras intestinais são violadas (NATARO et al., 1998).

As cepas patogênicas podem ser tanto intestinais, como extra-intestinais. As *Escherichia coli* que causam diarreia (DEC) são classificadas de acordo com seus mecanismos de virulência específicos, síndromes clínicas relacionadas e seus aspectos epidemiológicos em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004). Devido a sua associação com surtos esporádicos relacionados ao consumo de alimentos contaminados, bem como a virulência que pode ser associada com o desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica, a *E. coli* enterohemorrágica merece destaque (PENNINGTON, 2010).

### **1.7 *Streptococcus mutans***

A bactéria *S. mutans* é uma eubactéria, firmicute, imóvel, facultativa que se apresenta na forma de cocos pertencentes a microbiota autóctone da cavidade oral (HAMADA et al., 1980). O *S. mutans* é um dos colonizadores primários do biofilme supragengival e, em conjunto com algumas espécies de *Lactobacillus*, representa o principal agente infeccioso associado à cárie dental, patologia infecciosa mais prevalente em humanos (HARDIE, 1992; VAN HOUTE, 1994). Uma das características mais relevantes de *S. mutans* é sua capacidade de receber DNA exógeno, através do estímulo do peptídeo CSP (MARTIN et al., 2006). De fato, estudos comprovam que o genoma de *S. mutans* pode ser dividido em dois grandes grupos: genoma base (*core*) e o genoma dispensável. Esses estudos demonstram um alto grau de variabilidade genética das diferentes cepas de *S. mutans* quando comparadas com a cepa sequenciada *S. mutans* UA 159 (WATERHOUSE et al., 2006).

Em 2002 o genoma da linhagem UA 159 de *S. mutans* foi sequenciado na universidade de Oklahoma e disponibilizado no GenBank (NC 004350). Foram encontrados cerca de 280 genes (15% do total de ORFs) codificadores de sistemas de transporte (AJDIC et al., 2002). Os sistemas de transporte ativos da família ABC são os mais abundantes com mais de 60 transportadores, ou seja, 10% do número total de ORFs, da espécie (AMES et al., 1992; BOOS et al., 1996).

Inúmeros estudos demonstram que essa bactéria possui vários fatores de virulência importantes para sua patogenicidade como a habilidade de aderir firmemente à superfície dental, a produção de ácidos a partir de um grande número de carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro (acidogenicidade) e a capacidade de sobreviver e replicar em ambientes ácidos (aciduricidade) (HAMADA et al., 1984; MICHALEK et al., 1981). Sendo a capacidade de aderência/produção de biofilme a mais relevantes, por se tratar do passo inicial e essencial para o desenvolvimento da cárie dental, permitindo o contato direto da bactéria (e por conseguinte de seus produtos metabólicos) à superfície dental, e dificultando o acesso da saliva à mesma, impedindo assim a ação tamponante, que essa promove na presença do ácido láctico produzido por *S. mutans* (HAMADA et al., 1980). Esta capacidade de aderir à superfície dental pode ser aferida, de modo indireto *in vitro*, pela aderência promovida em superfícies abióticas, como placas de polipropileno (FRANCESCA et al., 2004).

A habilidade de metabolizar carboidratos da dieta do hospedeiro e gerar metabólitos ácidos provoca a desmineralização da estrutura dental e, por conseguinte, a formação de lesões de cárie (HAMILTON et al., 1991). Os níveis de pH da cavidade oral caem rapidamente após o metabolismo de açúcares para valores abaixo de 4,0 que são considerados letais para a maioria das espécies de microorganismos. Entretanto o *S. mutans*, dado a sua capacidade acidúrica, consegue tolerar esses ambientes ácidos (KAJFASZ et al., 2009).

O *S. mutans*, pertencente ao grupo viridans dos Estreptococos, e pode ser associado com casos de endocardite bacteriana em pacientes susceptíveis, como no caso da presença de lesão prévia nas válvulas cardíacas (NOMURA et al., 2006). Um modelo aplicado para correlato de patogênese de *S. mutans* está associado com a capacidade dessa espécie bacteriana matar larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com culturas bacterianas (ABRANCHES et al., 2011; KAJFASZ et al., 2010). Insetos possuem sistemas imunes complexos que eliminam patógenos por mecanismos similares aos usados por mamíferos, incluindo a produção de enzimas como a lisozima, espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos (KAVANAGH et al., 2004). Quando culturas de *S. mutans* são inoculadas na pró-pata destas larvas, as cepas virulentas levam à mielinização das *Gallerias*, diminuição na sua movimentação e eventualmente morte, comprovada pela ausência de responsividade ao toque mecânico (ABRANCHES et al., 2011).



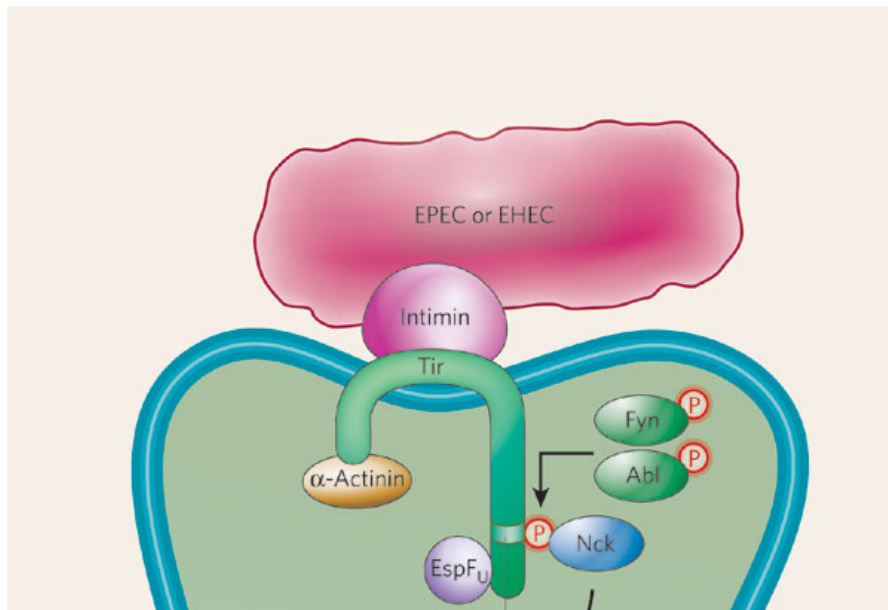
## 1.8 Enterobactérias - EHEC

A *Escherichia coli*, o outro modelo bacteriano analisado em nosso trabalho, é uma bactéria gram-negativa que pode ser classificada como saprófita, enteropatôgena ou patogêna extra-intestinal. Dentre as *E. coli* enteropatogênicas, neste trabalho, focamos na enterohemorrágica (EHEC), subgrupo da categoria de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (PERNA et al., 2001). Hospedeiros infectados por EHEC podem ser assintomáticos ou apresentar diarreia sanguinolenta – podendo desenvolver síndrome hemolítica urêmica (SHU) e/ou colite hemorrágica (CH) -, caracterizada por surtos ou casos isolados (CAPRIOLI et al., 2005; XIONG et al., 2012). A análise de prevalência de *E. coli* O157:H7 e demais sorotipos produtores de Stx demonstram uma presença maior dessas bactérias em carne de gado, especialmente carne moída. Sua distribuição entre os países desenvolvidos encontra-se tanto em gado de corte, como em gado leiteiro, sendo prevalente também no Brasil (CAPRIOLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008; TIMM et al., 2007).

As EHECs são caracterizadas por possuírem diversos fatores de virulência associados diretamente com sua adesão e com os efeitos sistêmicos que podem ser apresentados. Uma das características mais relevantes deste grupo patogênico está em sua capacidade de promover lesões e lise *in vitro* em culturas de células Vero, fato diretamente relacionado com a produção e secreção de toxinas Stx funcionais (ROJAS et al., 2010).

Esse patótipo bacteriano, assim como as EPECs, tem capacidade de promover uma adesão íntima com aos enterócitos humanos em um processo que se inicia por uma aderência frouxa dada pelo pilus BFP (*bundle-forming pilus*), seguida pela aderência íntima do conjunto intimina-Tir, denominada lesão A/E (*Attaching and effacing*) (Figura 5). A intimina é uma adesina bacteriana codificada pelo gene *eae*, presente em uma ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus for enterocyte effacement*), enquanto a proteína Tir é um receptor produzido pela própria bactéria e inserido na membrana citoplasmática da célula hospedeiro por um sistema de secreção do tipo III, ou injetossomo (VLISIDOU et al., 2006).

**Figura 5 – Lesão *Attaching and Effacing* de EHEC**



Lesão A/E de EHEC.

Fonte: Adaptado de Bhavsar et al. (2007).

Outro fator de virulência relevante em EHEC é a toxina de Shiga, Stx. Essa toxina tem a clássica conformação de uma toxina bacteriana do tipo AB<sub>5</sub>, com uma subunidade A ativa, que leva a interrupção da expressão proteica da célula do hospedeiro e cinco subunidades B que formam o pentâmero de interação com o receptor Gb3 presentes em algumas células humanas (JOHANNES et al., 2010).

Em conjunto com os testes *in vitro* de virulência, contamos com modelos de infecção animal para análise da patogenicidade de EHEC. Dois são os principais modelos experimentais, o uso de camundongos *germ-free* e o modelo de camundongos previamente tratados com estreptomicina para redução da carga de sua microbiota intestinal (MOHAWK et al., 2011). A grande vantagem do uso do modelo de camundongos tratados com estreptomicina é que este não requer condições especiais de cuidado e manipulação dos animais, bem como permite a análise da capacidade das cepas de EHEC aderirem e colonizarem camundongos com o sistema imunológico proficiente, fato que pode ser relacionado com a perda de peso do animal pós-infecção.

## 1.9 Mutagênese sítio-específica

Dentre as metodologias utilizadas para o estudo do papel de genes específicos na fisiologia e patogênese bacteriana está a deleção do gene específico por técnicas de mutagênese sítio-específica. As técnicas tradicionais de mutagênese sítio dirigidas empregadas em bactérias gram-negativas consiste na utilização de vetores que carregam um fragmento de DNA mutado, seguido de dois passos de recombinação para inserção correta do fragmento mutado e eliminação da base do plasmídeo do genoma bacteriano (OSHIRO et al., 2006). Uma das dificuldades desse tipo de abordagem é a realização da segunda etapa de recombinação para eliminação do plasmídeo que faz necessário o uso de contra-marcadores de seleção. Uma metodologia alternativa, buscando facilidade e rapidez, consiste na utilização de fragmentos lineares de DNA diretamente transformados nas células bacterianas. No entanto a maquinaria de recombinação de *Escherichia coli* não permite o emprego direto dessa abordagem, diferentemente de *S. mutans*. Para contornar esse empecilho, Datsenko et al. em 2000 demonstrou que o uso de recombinases do fago  $\lambda$  Red permite esse tipo de recombinação em *E. coli*. Entre as recombinases presentes temos gama ( $\gamma$ ) que tem por função formar um complexo, em dímero, com as proteínas RecBCD de *E.coli* e impedir que essas promovam a degradação do fragmento linear, a recombinase *exo* que reconhece e degrada parcialmente duplas fitas lineares de DNA em fitas simples na direção 5'-3', e por fim temos a recombinase beta, que liga-se as fitas simples nas porções 3' recém formadas no fragmento linear, direcionando o alelo mutado para seu homólogo natural, promovendo a denaturação da fita complementar de DNA e anelando-as para permitir a recombinação homóloga.

No caso dos *Streptococcus*, a capacidade natural de incorporar DNA exógeno e promover sua recombinação facilita o emprego direto de fragmentos lineares e não necessitam do emprego de plasmídeos ou de duas etapas de recombinação (JOHNSBORG et al., 2009).

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho observamos alguns pontos relevantes sobre o papel dos sistemas de transporte ABC na fisiologia e patogenicidade de bactérias do trato gastro-intestinal:

- o sistema de transporte de oligopeptídeos de *S. mutans* é pouco prevalente em cepas clínicas dessa espécie bacteriana, assim como não apresenta um papel relevante para o crescimento e virulência dessa bactéria nas condições laboratoriais testadas;
- a capacidade de transportar espermidina por *S. mutans* reduz sua capacidade de sobreviver em ambientes ácidos, fator importante para o desenvolvimento da cárie dental;
- o sistema de captação de fosfato inorgânico de *S. mutans* está presente no genoma e a deleção da proteína ligadora de substrato levou a redução na captação de Pi e na capacidade de crescimento celular. Além disso, foi observado uma redução na capacidade de aderência às superfícies abióticas;
- a internalização de glutamina e glutamato ocorre por dois sistemas parálogos de transporte, o Gln e o Gln. A eliminação do sistema que transporta preferencialmente glutamina aumentou a capacidade de aderência às superfícies abióticas, o que não foi observado para o sistema que capta preferencialmente glutamato;
- o sistema de transporte de oligopeptídeos de EHEC não modifica a patogenicidade desse patótipo bacteriano pelos parâmetros analisados.

### 6.1 Conclusão geral

Uma vasta gama de transportadores da família ABC são importantes para a internalização de diversos nutrientes e possuem relação direta ou indireta com a patogenicidade bacteriana. No entanto seu papel na patogênese deve ser rigorosamente analisado, visto que esse pode ou não ser mantido em bactérias do mesmo gênero, ou em bactérias de gêneros distintos, mas que colonizam o mesmo sistema funcional no hospedeiro. Nosso trabalho contribuiu para o esclarecimento

desses papéis em duas bactérias do trato gastro-intestinal, com foco em *S. mutans*, agente etiológico da cárie dental e *E. coli* enterohemorrágica.

## REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, J. et al. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. **Infect. Immun.**, v. 79 n. 6, p. 2277-2284, 2011.
- ACOSTA, M. B. R. et al. Intracellular polyamine pools, oligopeptide-binding protein A expression, and resistance to aminoglycosides in *Escherichia coli*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 789-793, 2005.
- AHN, S. J.; LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 9, p. 3028-3038, 2005.
- AJDIC, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **PNAS**, v. 99, n. 22, p. 14434-14439, 2002.
- ALLOING, G. et al. Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 75-83, 1998.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLASTP: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMES, B. N. et al. Illicit transport: the oligopeptide permease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 70, p. 456-458, 1973.
- AMES, G. F. et al. Traffic ATPases: a superfamily of transport proteins operating from *Escherichia coli* to humans. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 65, p. 1-47, 1992.
- ANDREWS, J. C.; SHORT, S. A. Genetic analysis of *Escherichia coli* oligopeptide transport mutants. **J. Bacteriol.**, v. 161, n. 2, p. 484-492, 1985.
- BATISSON, I. et al. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 8, p. 4516-4525, 2003.
- BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals groups and its role in the caries process. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 33, n. 4, p. 248-255, 2005.
- BENTANCOR, L. V. et al. A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, p. 712-718, 2009.

---

De acordo com:

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

BERGER, E. A. Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 70, n. 5, p. 1514-1518, 1973.

BHAVSAR, A. P.; GUTTMAN, J. A.; FINLAY, B. B. Manipulation of host-cell pathways by bacteria pathogens. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 827-834, 2007.

BOOS, W. et al. Periplasmic binding protein dependent ABC transporters. In: NEIDHARDT, F. C. et al. **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1996. p. 1175-1209.

BOREZEE, E.; PELLEGRINI, E.; BERCHE, P. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 7069-7077, 2000.

BRANDL, C. J.; DEBER, C. M. Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. **Proceed. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 4, p. 917-921, 1986.

BRYAN, E. M. et al. Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. **Plasmid**, v. 44, n. 2, p. 183-190, 2000.

BUCKLES, E. L. et al. PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 153-160, 2006.

CAPRIOLI, A. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and models of transmission. **Vet. Res.**, V. 36, p. 289-311, 2005.

CASTAÑO, I.; BASTARRACHEA, F.; COVARRUBIAS, A. A. *gltBDF* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, n. 170, p. 821-827, 1988.

CHEN, G.; RUSSEL, J. B. Transport of glutamine by *Streptococcus bovis* and conversion of glutamine to pyroglutamic acid and ammonia. **J. Bacteriol.**, n. 171, p. 2981-2985, 1989.

CHENG, C. et al. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 5, p. 1936-1944, 2009.

CHILDS, A. C.; MEHTA, D. J.; GERNER, E. W. Polyamine-dependent gene expression. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 60, n. 7, p. 1394-1406, 2003.

CORNELIS, P.; MATTHIJS, S. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. **Environ. Microbiol.**, v. 2, n. 12, p. 787-798, 2002.

COYKENDALL, A. L. Genetic heterogeneity in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, v. 106, n. 1, p. 192-196, 1971.

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

DASHPER, S. G.; RILEY, P. F.; REYNOLDS, E. C. Characterization of glutamine transport in *Streptococcus mutans*. **Oral Microb. Immun.**, n. 10, p. 183-187, 1995.

DASSA, E.; BOUIGE, P. The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Res. Microbiol.**, v. 152, n. 3-4, p. 211-229, 2001.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **PNAS**, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, 2000.

FRANCESCA, B. et al. Both lactoferrin and iron aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **BioMetals**, v. 17, n. 3, p. 271-278, 2004.

GOODELL, E. W.; HIGGINS, C. F. Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 8, p. 3861-3865, 1987.

GUIMARÃES, K. S. **Análise do sistema ativo de captação de glutamina de *Streptococcus mutans***. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J. Dent. Res.**, v. 63, n. 3, p. 407-411, 1984.

HAMILTON, I. R.; BUCKLEY, N. D. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. **Oral Microb. Immun.**, v. 6, n. 2, p. 65-71, 1991.

HARDIE, J. M. Oral Microbiology: current concepts in the microbiology of dental carie and periodontal disease. **Brazil. Dent. J.**, v. 172, n. 7, p. 217-278, 1992.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 67-113, 1992.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Res. Microbiol.**, v. 152, n. 3-4, p. 205-210, 2001.

IZABEL, H. A. **Estudo da proteína OppA em amostras diarreio gênicas de *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella***. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.



JACOBSEN, S. M. et al. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 180-193, 2008.

JOHANNES, L.; RÖMER, W. Shiga toxins - from cell biology to biomedical applications. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2010.

JOHNSBORG, O.; HAVARSTEIN, L. S. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 33, n. 3, p. 627-642, 2009.

KAJFASZ, J. K. et al. Role of Clp protein in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 7, p. 2060-2068, 2009.

KAJFASZ, J. K. et al. Two Spx proteins modulate stress tolerance, survival, and virulence in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 10, p. 2546-2556, 2010.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KASHIWAGI, K. et al. Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 21, p. 12205-12208, 1996.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.

KEEN, J. N.; FINDLAY, J. B. C. Protein sequencing techniques. In: MEYERS, R. A. (Ed.) **Molecular biology and biotechnology**: a comprehensive desk reference. New York: VCH Publish, 1995. p. 771-773.

KIM, K. H. et al. Structural basis for glutamate racemase inhibition. **J. Mol. Biol.**, n. 372, p. 434-443, 2007.

KLEPSCH, M. M. et al. *Escherichia coli* peptide binding protein OppA has a preference for positively charged peptides. **J. Mol. Biol.**, v. 414, p. 75-85, 2011.

KRASTEL, K. et al. Characterization of a glutamate transporter operon, *glnQHMP*, in *Streptococcus mutans* and its role in acid tolerance. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 4, p. 984-993, 2010.

LAMARCHE, M. G. et al. Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4138-4145, 2005.

LAMARCHE, M. G. et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 32, p. 461-473, 2008.

LARSON, T. J. *glpT*-Dependent transport of *sn*-glycerol-3-phosphate in *Escherichia coli* K-12. In: TORRIANI-GORINI, A. et al. **Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987. p. 164-169.

LEE, E. M. et al. Identification of oligopeptide permease (*opp*) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by *oppA* knockout mutation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 240, p. 21-30, 2004.

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

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

LORCA, G. L. et al. Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1768, n. 6, p. 1342-1366, 2007.

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

LUZ, D. E. et al. The Pst system of *Streptococcus mutans* is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 27, n. 3, p. 172-181, 2012.

MALONEY, P. et al. Anion-exchange mechanisms in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 1-17, 1990.

MARTIN, B. et al. Independent evolution of competence regulatory cascades in streptococci? **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 8, p. 339-345, 2006.

METCALF, B. W. et al. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 100, n. 8, p. 2551-2553, 1978.

MICHALEK, S. M. et al. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infect. Immun.**, v. 33, n. 3, p. 690-696, 1981.

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

MOHAWK, K. L.; O'BRIEN, A. D. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. **J. Biomed. Biotechnol.**, 2011. doi: 10.1155/2011/258185.

MONNET, V. Bacterial oligopeptide-binding proteins. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 60, n. 10, p. 2100-2114, 2003.

MOUTRAN, A. et al. The oligopeptide permease (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Curr. Microbiol.**, v. 48, p. 354-359, 2004.

MURASHIMA, K. et al. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* *engB*, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 1, p. 76-81, 2002.

NAIDER, F.; BECKER, J. M. Multiplicity of oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 122, n. 3, p. 1208-1215, 1975.

NAKAMATSU, E. H. et al. Oligopeptide uptake and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. **FEMS Microb. Lett.**, v. 269, p. 229-233, 2007.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 142-201.

NEPOMUCENO, R. S. L. et al. The oligopeptide (*opp*) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence, and characterization. **Oral Microb. Immun.**, v. 22, n. 4, p. 277-284, 2007.

NOJI, S. et al. Effect of intracellular pH and potassium ions a primary transport system for a glutamate/aspartate in *Streptococcus mutans*. **Eur. J. Biochem.**, n. 175, p. 491-495, 1988.

NOMURA, R. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from patient with infective endocarditis. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1135-1140, 2006.

NOVAK, R. et al. Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. **J. Bact.**, v. 181, n.4, p. 1126-1133, 1999.

NGUYEN, H. D.; PHAN, T. T. P.; SCHUMANN, W. Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Curr. Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 89-93, 2007.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 127, n. 1-2, p. 139-146, 2008.

OSHIRO, E. E. et al. Site-directed gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. Microbiol. Method.**, v. 65, n. 1, p. 171-179, 2006.

- PARK, J. T. et al. MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 5, p. 1215-1223, 1998.
- PEARCE, B. J.; NAUGHTON, A. M.; MASURE, H. R. Peptide permeases modulate transformation on *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microb.**, v. 12, n. 6, p. 881-892, 1994.
- PENNINGTON, H. *Escherichia coli* O157. **Lancet**, v. 376, p. 1428-1435, 2010.
- PERNA, N. T. et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 529-533, 2001.
- PERRY, D.; WONDRACK, L. M.; KURAMITSU, H. K. Genetic transformation of putative cariogenic properties in *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 41, n. 2, p. 722-727, 1983.
- POLISSI, A. et al. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 12, p. 5620-5629, 1998.
- POOLMAN, B.; SMID, E. J.; KONINGS, W. N. Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine transport system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. **J. Bacteriol.**, n. 169, p. 2755-2761, 1987.
- RAKSAJIT, W.; MÄENPÄÄ, P.; INCHAROENSAKDI, A. Putrescine transport in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, n. 4, p. 394-399, 2006.
- RAO, N. N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Mol. Microb.**, v. 4, n. 7, p. 1083-1090, 1990.
- REID, G. et al. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 27-38, 2011.
- RHEE, H. J.; KIM, E. J.; LEE, J. K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 11, n. 4, p. 685-703, 2007.
- ROBINSON, C. M. et al. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. **PNAS**, v. 103, n. 25, p. 9667-9672, 2006.
- ROCHA, L. B.; PIAZZA, R. M. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 411-417, 2007.
- ROJAS, R. L. G. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains expressing a nontoxic Shiga0like toxin 2 derivative induce partial protective immunity to the toxin expressed by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 529-536, 2010.

RUDNER, D. Z. et al. The spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 4, p. 1388-1398, 1991.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.

SATO, Y. et al. Dual mechanism for stimulation of glutamate transport by potassium ions in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, n. 171, p. 4963-4966, 1989.

SHAH, P. et al. Cellular location of polyamine transport protein PotD in *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 261, p. 235-237, 2006.

SHEN, Q. et al. Proton nuclear magnetic resonance studies on glutamine-binding protein from *Escherichia coli*: formation of intermolecular and intramolecular hydrogen bonds upon ligand binding. **J Mol. Biol.**, n. 210, p. 849-857, 1989.

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

SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **J. Parent. Ent. Nutr.**, n. 14, p. 40S-44S, 1990.

SOUALHINE, H. et al. A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. **Mol. Microb.**, v. 58, n. 5, p. 1430-1440, 2005.

SPERANDIO, V. **RED system doubts** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <betonep@usp.br> em 14 set. 2009.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines in microorganisms. **Microb. Rev.**, v. 49, n. 1, p. 81-99, 1985.

TAMURA, G. S.; NITTAYAJAR, A.; SCHOENTAG, D. L. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. **Infect. Immun.**, n. 70, p. 2877-2885, 2002.

TAO, L. et al. Transport of sugars, including sucrose, by the *msm* transport system of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, n. 72, p. 1386-1390, 1993a.

TAO, L. et al. Transformation efficiency of EMS-induced mutants of *Streptococcus mutans* of altered cell shape. **J. Dent. Res.**, v. 72, n. 6, p. 1032-1039, 1993b.

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

TIMM, C. D. et al. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 419-425, 2007.

VAN HOUTE, J. Role of microorganisms in caries etiology. **J. Dent. Res.**, v. 73, n. 3, p. 672-681, 1994.

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

VAN VEEN, H. W. et al. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1766-1770, 1993.

VAZ, T. M. et al. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 903-905.

VLISIDOU, I. et al. Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 758-764, 2006.

XIONG, Y. et al. A novel *Escherichia coli* O157:H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China. **PLOS One**, v. 7, n. 4, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0036144.

WANNER, B. L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **J. Cell. Biochem.**, v. 51, n. 1, p. 47-54, 1993.

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

WANNER, B. L. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. In: NEIDHARDT, F. C. et al. **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1996. p. 1357-1381.

WARE, D. et al. Involvement of *potD* in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 352-361, 2006.

WARE, D.; WATT, J.; SWIATLO, E. Utilization of putrescine by *Streptococcus pneumoniae* during growth in choline-limited medium. **J. Microb.**, v. 43, n. 5, p. 398-405, 2005.

WATERHOUSE, J. C.; RUSSELL, R. R. Dispensable genes and foreign DNA in *Streptococcus mutans*. **Microb.**, v. 152, p. 1777-1788, 2006.

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

YAN, D. Protection of the glutamate pool concentration in enteric bacteria. **PNAS**, n. 104, p. 9475-9480, 2007.

YOHANNES, E. et al. Polyamine stress at high pH in *Escherichia coli*. **BMC Microb.**, v. 5, p. 59, 2005.

YOSHIDA, A.; KURAMITSU, H. K. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 12, p. 6283-6291, 2002.