

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/09/2021.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Midian Clara Castillo Pedraza

Modulação de genes e de seus produtos afeta a virulência de *Streptococcus mutans*

Araraquara

2019



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Midian Clara Castillo Pedraza

Modulação de genes e de seus produtos afeta a virulência de *Streptococcus mutans*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Reabilitação Oral, na Área de Prótese

Orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Araraquara

2019

Castillo Pedraza, Midian Clara

Modulação de genes e de seus produtos afeta a virulência de *Streptococcus mutans* / Midian Clara Castillo

Pedraza. -- Araraquara: [s.n.], 2019

99 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Reabilitação oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

1. Cárie dentária 2. *Streptococcus mutans* 3. Placa dentária I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Midian Clara Castillo Pedraza

Modulação de genes e de seus produtos afeta a virulência de *Streptococcus mutans*

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

2º Examinador: Profa. Dra. Janaína de Cassia Orlandi Sardi

3º Examinador: Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva

4º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

5º Examinador: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

Araraquara, 18 de setembro de 2019

DADOS CURRICULARES

Midian Clara Castillo Pedraza

NASCIMENTO: 23/01/1990 – Santa Marta, Magdalena – Colômbia

FILIAÇÃO: Eunice Ester Pedraza Naranjo (Mãe)
Alberto Enrique Castillo Padilla (Pai)

2016/2019 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr, Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

2018/2019 Curso de Aperfeiçoamento em Prótese Fixa: Estética com Ênfase em Restaurações Adesivas Indiretas
Associação Paulista de Cirurgião Dentistas, APCD, Araraquara-Brasil

2014/2016 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr, Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

2006/2012 Curso de Graduação em Odontologia
Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Magdalena, Santa Marta - Colômbia

Dedico esse trabalho a minha vovó Ana Naranjo (*in memoriam*), com todo meu amor e gratidão, à mulher que foi meu maior apoio desde sempre e contribuiu incansavelmente para formar a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que a cada dia me abençoa com sabedoria, me dando forças para permanecer firme nos meus objetivos, e pela saúde que me fornece quando é preciso.

Aos meus pais Eunice Pedraza e Alberto Castillo, que são minha motivação e meu exemplo. Por tudo o que fizeram e ainda continuam fazendo por mim. Pela compressão, paciência, amor e todos os valores que me ensinaram para me tornar o que eu sou hoje. Minha motivação é ser motivo de orgulho sempre para eles.

Ao meu namorado Jorge Homero Wilches, pela companhia e força em cada aventura que desejo conquistar. Pelo exemplo que ele me dá de profissionalismo e pelo amor oferecido em cada momento.

A minha orientadora Marlise Inêz Klein, pela paciência que teve desde o meu mestrado. Foi uma benção ter ela nestes anos acadêmicos. Os conhecimentos e orientações aprendidos, serão chaves no meu futuro.

Ao meu coorientador Pedro Luiz Rosalen, pelos seus conhecimentos, tempo e dedicação que foram importantes para execução deste trabalho. Ter ele neste processo acadêmico, foi uma honra.

A toda minha família Castillo / Pedraza, (Beatriz Pedraza, Anyela Daza, Daniela Ramirez), por acreditar em mim, meu sucesso é de vocês.

A minha família Wilches Visbal (Sandra Visbal e Homero Wilches) obrigada pelo carinho, conselhos e preocupações.

A Uxua Ortecho (Chatita) e o Danny Mendoza, pelo carinho que eles me transmitiram em todos os anos que estive no Brasil, a companhia deles amenizou a distância de minha família na Colômbia, porque eles se tornaram mais um de minha família.

A minha família latina, hispano-falante: Alejandro Cardena, Elkin Florez, Héran Coaguila, Jeffersson Trigo, Juan Francisco Mariscal, Laura Gonzalez, Patricia Maquera, Ranulfo Castillo, Victor Ochoa e Yuliana Vega, pela amizade e carinho, a convivência com eles ficará marcada por sempre na minha vida. Agradeço a Deus por colocar cada um deles nesta correria da vida.

A Jaqueline Colin, pela companhia constante em meus experimentos, pela mão que me deu quando as coisas se tornavam difíceis e por acreditar em mim.

A todos meus amigos brasileiros, por tornar meus dias agradáveis e me acolher como amiga, em especial a Cristiane Inagati, Rafael Ribeiro, Carla Duque, Geisiane Bueno e Kleyton Lacerna.

Ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, FOAr-UNESP, em especial à Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina.

Ao Prof. Dr. Ewerton Garcia Mima e à Profa. Dra Janaina Habib Jorge pela aceitação no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Laboratório de Cultura de Células e Engenharia de Tecidos, FOAr-UNESP, que foi muito importante para desenvolver parte desta pesquisa.

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro, nas modalidades bolsa de doutorado com reserva técnica (Processo nº 2017/00753-0) e auxílio à pesquisa (Processo nº 2014/05423-0), essenciais para a realização dessa pesquisa.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 141896/2017-5), pela bolsa e o auxílio financeiro (taxa de bancada) durante 5 meses para a realização deste trabalho.

A FOP/UNICAMP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, que gentilmente abriu as portas para que eu pudesse realizar parte deste trabalho.

“Há um momento em que todos os obstáculos são derrubados, todos os conflitos se apartam e à pessoa ocorrem coisas que não tinha sonhado, e então não há na vida nada melhor que escrever. Isso é o que eu chamaria de inspiração”.

Gabriel García Márquez*

* Gabriel García M. Questionário Proust. Inglaterra: 2000

Castillo Pedraza MC. Modulação de genes e de seus produtos afeta a virulência de *Streptococcus mutans* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

Streptococcus mutans orchestra a formação de biofilmes cariogênicos através da produção da matriz extracelular que contém exopolissacarídeos (EPS), DNA extracelular (eDNA) e ácidos lipoteicóicos (LTA). EPS são um marcador de virulência para cárie, mas não está claro como os genes associados com eDNA (*lytS* e *lytT*) e LTA (*dltA* e *dltD*) afetam a virulência de *S. mutans*. Portanto, avaliou-se como os genes *lytST*, *dltAD* e *gtfB* (EPS-insolúveis) afetariam o desenvolvimento de lesões cariosas em ratos e a sobrevivência de larvas (*Galleria mellonella*) após infecção sistêmica e para esclarecer sua contribuição na patogenicidade dessa bactéria. Ainda, avaliou-se o efeito dos tratamentos tópicos com miricetina (afeta a síntese de EPS), composto 1771 (modula o metabolismo do LTA) e flúor (prevenção da cárie) sobre biofilmes *in vitro* de *S. mutans*. Alimentou-se os ratos com dieta cariogênica e inoculou-se com cepa parental UA159 e cepas com deleção de genes Δ *lytS*, Δ *dltD* e Δ *gtfB* (n=14). Após 5 semanas, avaliou-se as populações microbianas (cultivável total e *S. mutans*) e as lesões de cárie. Injetou-se a cepa parental e as cepas com deleção de genes Δ *gtfB*, Δ *lytS*, Δ *lytT*, Δ *dltA* e Δ *dltD* na hemocele de larvas e registrou-se a sobrevivência das larvas longitudinalmente (n=10). Formou-se biofilmes de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita revestidos com película salivar e realizou-se tratamentos tópicos duas vezes ao dia: miricetina (Mir), composto 1771, flúor (F) Mir+1771, Mir+F, 1771+F, Mir+1771+F e veículo (controle) (n=6). Determinou-se nesses biofilmes diversos parâmetros: biomassa, população, componentes da matriz (EPS solúveis e insolúveis em água, eDNA e LTA), arquitetura tridimensional e expressão gênica. Ainda, avaliou-se a citotoxicidade dos tratamentos (n=8). Na análise da população microbiana em ratos, a proporção de *S. mutans* na microbiota total recuperada foi maior para o grupo UA159 *versus* os grupos com deleção (15, 3 e 6 vezes para Δ *gtfB*, Δ *lytS* e Δ *dltD*, respectivamente). UA159 produziu maior número de lesões de cárie, com maior severidade (lesões em dentina): no esmalte (50% mais lesões) e na dentina (\geq 80% mais cavidades) de superfícies lisas e superfície sulcal (\cong 30% mais lesões em esmalte e \geq 60% mais lesões em dentina) ao ser comparada com as cepas com deleção. A sobrevivência de *G. mellonella* foi menor em larvas infectadas com UA159, seguido de Δ *gtfB* quando comparado com as outras cepas com deleção gênica. Tratamentos com miricetina e composto 1771 isolados resultaram em biofilmes com menores contagens de *S. mutans*, biomassa, EPS solúveis e insolúveis (vs. veículo). Entretanto, a combinação Mir+1771+F foi mais eficaz, pois diminuiu a contagem de *S. mutans* (3 logs), biomassa (60%), EPS solúveis (74%) e insolúveis (87,5%) (vs. veículo). Ainda, essa estratégia afetou negativamente eDNA, LTA, alterou o tamanho das microcolônias e inibiu a expressão dos genes *gtfBC*. Adicionalmente, os tratamentos Mir+1771 e Mir+F (vs. controle de viabilidade) foram levemente

citotóxicos (redução de viabilidade celular em 13% e 25%, respectivamente). Portanto, os genes *lytST*, *dltAD* e *gtfB* contribuem para a cariogenicidade e a virulência de *S. mutans*; a estratégia com miricetina e composto 1771 modula os produtos destes genes, tornando-a promissora para o controle desses biofilmes.

Palavras chave: Cárie dentária. *Streptococcus mutans*. Placa dentária.

Castillo Pedraza MC. Modulation of genes and their products affects the virulence of *Streptococcus mutans* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

Streptococcus mutans orchestrates the cariogenic biofilms formation through the production of an extracellular matrix that contains exopolysaccharides (EPS), extracellular DNA (eDNA), and lipoteichoic acids (LTA). EPS is a virulence marker of dental caries, but it is unclear how genes associated with eDNA (*lytS* and *lytT*) and LTA (*dltA* and *dltD*) affect *S. mutans* virulence. Therefore, this study evaluated how the genes *lytST*, *dltAD* and *gtfB* (insoluble EPS) affected the development of carious lesions in rats and the survival of larvae (*Galleria mellonella*) after systemic infection to clarify its contribution to the pathogenicity of *S. mutans*. Also, it assessed the effect of topical treatments with myricetin (affects EPS synthesis), compound 1771 (modulates LTA metabolism) and fluoride (caries prevention) on *in vitro* *S. mutans* biofilms. The rats received a cariogenic diet and were inoculated with the parental strain UA159 and its strains with deletion of genes Δ *lytS*, Δ *dltD*, and Δ *gtfB* (n=14). After five weeks, viable microbial populations (total cultivable and *S. mutans*) and caries lesions were evaluated. Larvae were inoculated by intra-hemocoel injection with the parental strain and deletion strains Δ *gtfB*, Δ *lytS*, Δ *lytT*, Δ *dltA*, and Δ *dltD*, and larval survival was recorded longitudinally (n=10). *S. mutans in vitro* biofilms were formed on saliva-coated hydroxyapatite discs and topically treated twice-daily: Myricetin (Myr), Compound 1771, Fluoride (F), Myr+1771, Myr+F, 1771+F, Myr+1771+F, and vehicle-control (n=6). The biofilms were evaluated to determine biomass, viable *S. mutans* counts, matrix components (water-soluble and -insoluble EPS, eDNA, and LTA), tridimensional architecture, and gene expression. Also, the cytotoxicity of the treatments was evaluated. In the rodent caries model, the proportion of *S. mutans* in total microbiota recovered was higher for the UA159 group versus the deletion groups (15, 3 and 6-fold for Δ *gtfB*, Δ *lytS*, and Δ *dltD*, respectively). The parental strain UA159 yielded higher number of caries lesions that were also more severe (lesions in dentin): on enamel (50% more lesions) and dentin (\geq 80% more cavities) of smooth surfaces, and on enamel (\cong 30% more lesions) and dentin (\geq 60% more lesions) sulcal surfaces when compared to the deletion strains. The *G. mellonella* survival was lower in UA159-infected larvae, followed by Δ *gtfB*-infected when compared to other gene deletion strains. Topical treatments with either myricetin or compound 1771 alone led the biofilms with lower amounts of *S. mutans* viable counts, biomass, water-soluble, and water-insoluble EPS (vs. vehicle). However, the combination Myr+1771+F was more efficient, as it decreased 3 logs of *S. mutans* counts, \cong 60% of the biomass, 74% of % water-soluble EPS, and 87.5% of water-insoluble EPS counts (vs. vehicle). Also, this strategy negatively affected eDNA, LTA, altered the size of microcolonies, and inhibited the expression of *gtfBC* genes. Additionally, Mir+1771 and Mir+F (25%) treatments (vs. viability control) were mildly cytotoxic (reduction of viability by 13% and

25%, respectively). Therefore, the genes *lytST*, *dltAD*, and *gtfB* contribute to the cariogenicity and virulence of *S. mutans*; a strategy with myricetin and compound 1771 modulates the products of these genes, making it a promissory approach to control cariogenic biofilms.

Keywords: Dental caries. *Streptococcus mutans*. Dental biofilm.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	18
3 PUBLICAÇÕES	19
3.1 Publicação 1	20
3.2 Publicação 2	50
4 DISCUSSÃO	84
5 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A	94
ANEXO B	95
ANEXO C	96
ANEXO D	98

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária acontece pela constante produção de metabólitos microbianos (ácidos orgânicos), que acidificam o biofilme e afetam os cristais de hidroxiapatita (desmineralização)¹, que é o principal componente no esmalte. A desmineralização é considerada “normal” quando é alternada com a remineralização (íons de cálcio e fosfato na saliva ajudam a evitar a perda de tecido mineralizado) com o objetivo de neutralizar os processos degenerativos da cárie^{2,3,4}. Quando a desmineralização supera este processo dinâmico, aparecem lesões cariosas irreversíveis que, se não tratadas adequadamente, podem levar ao detrimento dentário.

Interações entre substrato (dente), dieta rica em carboidratos e biofilme microbiano^{1,5,6,7} são necessárias para a ocorrência da cárie. Além disso, outros fatores podem interagir e contribuir com a doença, como os fatores ambientais dentro da cavidade bucal (higiene, fluxo salivar, pH, proteínas, Ca^{2+} , PO_4^{3-}) e fatores pessoais do indivíduo (renda, perfil sócio - demográfico, acesso à saúde dental, atitudes)^{1,8}. A cárie pode afetar crianças e adultos sem distinção de sexo ou cultura, tornando-se um problema de saúde pública mundial^{9,10}.

A cárie pode não apresentar sintomas, mas na maioria dos eventos avançados (com presença de cavidades), o indivíduo sente desconforto e dor intensa, acompanhado de inflamação na polpa e/ou abscesso dentário, tornando a pessoa incapaz para exercer atividades diárias¹¹. Neste caso, o tratamento pode ser endodôntico ou exodontia. A perda dentária pode gerar baixa autoestima, problemas na fonética, dificuldade no processamento dos alimentos e na interação social.

Estratégias de prevenção da cárie incluem a escovação diária com dentífrico contendo flúor (mínimo três vezes ao dia)¹², a utilização do fio dental (mínimo uma vez ao dia), restrição de açúcares na dieta e consultas com o cirurgião-dentista para profilaxia dentária (cada 6 meses), aplicação de flúor e selantes¹¹. Entretanto, com todas essas estratégias, a cárie continua sendo considerada a doença mais prevalente no mundo. Segundo *Global Burden of Disease Study* (GBD) 1990 - 2016, as doenças na cavidade bucal afetam a metade da população mundial (3580 milhões), sendo a cárie a mais prevalente entre elas¹³. Estima-se que, no mundo, 2400 milhões de pessoas apresentam cárie em dentes permanentes e 489 milhões de crianças sofrem de cáries nos dentes decíduos¹³.

Existem aproximadamente 700 espécies de microrganismos que habitam a cavidade bucal¹⁴, onde *Streptococcus mutans* desempenha um papel importante na etapa de transição da forma não-patogênica para biofilmes altamente cariogênicos¹⁵. Embora existam outros microrganismos que apresentem a capacidade de produzir ácido e viver no ácido, *S. mutans* destaca-se pela sua capacidade de produzir uma matriz extracelular rica em exopolissacarídeos¹⁶. *S. mutans* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos; e tem sido estudado por meio de diversas técnicas bioquímicas, sorológicas e genéticas.

Os carboidratos disponíveis na dieta diária favorecem a formação de um biofilme altamente coesivo. Os microrganismos utilizam a sacarose para modular a construção da matriz extracelular mediante as frutossiltransferases (Ftfs) e glicosiltransferases (Gtfs), que sintetizam exopolissacarídeos (EPS)^{15,17-20}. Ainda, a presença de amido aumenta o poder cariogênico da sacarose^{22,23}. A ingestão frequente desses carboidratos intercalados aumenta a aderência de *S. mutans* e demais microrganismos sobre a superfície de hidroxiapatita²⁴, favorecem a produção ácida dentro do biofilme^{20,25} e proporciona estabilidade e integridade à matriz extracelular^{19,26-28}.

A capacidade de *S. mutans* para formar biofilmes com uma matriz extracelular rica em EPS é significativa para a ocorrência da cárie²⁹, mas também existe relação com casos de bacteremia e de endocardite infecciosa (EI) com o desenvolvimento de biofilme formado por esse microrganismo^{30,31}. EI é uma infecção no endocárdio normalmente acontece quando uma bactéria de outra parte do corpo, como as encontradas na cavidade bucal, se dissemina pela corrente sanguínea alojando-se nas áreas danificadas do revestimento interno do coração (endocárdio). As bactérias aproveitam as condições favoráveis de crescimento para deposição e formação de biofilme³². Independentemente do lugar da formação do biofilme, todo biofilme tem pelo menos uma propriedade em comum, a presença de uma matriz derivada de microrganismos³³.

Matriz extracelular é considerada como uma barreira de proteção contra substâncias nocivas que impedem o desenvolvimento do biofilme³³. Matriz extracelular de biofilmes cariogênicos tem os EPS como componentes indispensáveis para a sua construção e estruturação tridimensional (3D)^{19,33,34}. *S. mutans* é um grande produtor de substâncias poliméricas extracelulares incluindo EPS, DNA

extracelular (eDNA) e ácido lipoteicóico (LTA)^{16,24,33,34}. Esses componentes encontrados na matriz, são importantes para sua construção²⁴. Ainda, são identificados dentro da matriz de biofilmes orais outros componentes: proteínas, lipídios e lipopolissacarídeos (derivados de espécies Gram negativas)³⁵⁻³⁷.

O eDNA fornece integridade estrutural e estabilidade nos biofilmes de *S. mutans*²³. Este componente da matriz pode ser liberado durante o processo de lise celular e morte celular ou em algum momento pode também ser secretado por microvesículas ligadas à membrana³⁸. A expressão dos genes *lytST*, *IrgAB* e *cidAB* de *S. mutans* estão relacionados com a presença de eDNA na matriz, quando os carboidratos da dieta e as condições ambientais são favoráveis^{23,39}. O sistema *IrgAB* / *cidAB* é importante na formação do biofilme, na tolerância ao estresse oxidativo e na regulação da autólise; estas funções são reguladas pelo sistema de dois componente *lytST* através da disponibilidade de carboidrato via a proteína *ccpA* (do inglês *catabolite control protein A*)^{39,40}.

O LTA está associado à aderência de estreptococos orais^{41,42} e desempenha um papel significativo na colonização de bactérias Gram positivas, contribuindo com a formação e a patogenicidade do biofilme^{41,42}. LTA encontra-se ligado na membrana celular por uma lipoproteína e podem ser liberados para o ambiente extracelular⁴³⁻⁴⁵, especialmente durante a remodelagem da parede celular. O metabolismo deste componente encontra-se associado à expressão dos genes do operon *dltABCD* e *SMU.775* de *S. mutans*^{24,45,46}. Os genes de operon *dltABCD* adicionam os resíduos de D-alanina que favorecem a aderência das bactérias e a construção do biofilme^{45,47,48}. O gene *SMU.775* (proteína hipotética) pode estar realizando a função do gene *LtaS* de *Staphylococcus aureus* e sintetizar o ácido lipoteicóico poliglicerol-fosfato a partir de fosfatidilglicerol^{35,49}.

Assim, uma pesquisa in vitro com *S. mutans* cepa parental UA159 e cepas com deleções de genes específicos utilizados para modular eDNA (Δ *lytS* e Δ *lytT*), LTA (Δ *dltA* e Δ *dltD*) e EPS insolúvel (Δ *gtfB*), avaliou a composição bioquímica da matriz²⁴. Esse estudo detectou a presença de eDNA, LTA, EPS solúveis e insolúveis em água e proteínas solúveis na matriz de biofilmes monoespécie de *S. mutans* (cepa parental UA159 e cepas com deleção dos genes *gtfB*, *lytS*, *lytT*, *dltA* e *dltD*) e mistos (*S. mutans* – cepa parental UA159 ou mutante, *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces naeslundii*), avaliados em dois momentos 67 e 115 horas. A deleção de genes específicos afetou

não só a composição da matriz, mas também a dinâmica de populações bacterianas e a arquitetura 3D de biofilmes. O desenho experimental de biofilme *in vitro* utilizado, também mostrou que a ausência dos genes *lytS* e *lytT* induziram maior liberação de eDNA; o mesmo ocorreu para os genes *dltA* e *dltD* quanto a presença de LTA. Ainda, esses biofilmes mostraram aumento de EPS solúveis e insolúveis, que se incrementam ainda mais durante a maturação. Portanto, alterações nos processos de liberação de eDNA, LTA e EPS podem modificar a composição da matriz e interferir na formação do biofilme²⁴.

S. mutans possivelmente apresenta outros sistemas que são ativados para compensar a ausência de atividades dos sistemas *lytST* e *dltABCD* que também mantém as propriedades estruturais e funcionais da matriz do biofilme, pois era esperado que a deleção de *lytS* e *lytT* diminuísse a quantidade de eDNA e que a deleção de *dltA* e *dltD* reduzisse a quantidade de LTA na matriz (*versus* a cepa parental). No entanto, os dados mostraram mais eDNA e LTA em biofilmes com as respectivas cepas de deleção e a estrutura 3D foi distinta quando comparada à cepa parental²³. Essas características poderiam ser por causa de alterações na remodelação e composição da parede celular (e carga)^{39,40,47,50,51}. Porém, é imprescindível esclarecer minuciosamente as funções desses componentes, para compreender a fisiologia do biofilme e assim direcionar terapias para prevenir e/ou remover biofilmes cariogênicos.

Assim, essa pesquisa forneceu subsídios para a proposição de estudos mais detalhados do potencial de eDNA e LTA em conjunto com EPS na virulência de *S. mutans*. Além disso, este estudo avaliou agentes (com ação antimicrobiana) para reduzir o desenvolvimento de biofilme de *S. mutans*, interferindo nas funções da matriz. Investigar como esses genes influenciam na ocorrência e severidade de cárie ajudarão a entender melhor a biologia de *S. mutans* e a inibição das funções e ou composição da matriz pela aplicação de agentes específicos poderiam interferir nos processos de estruturação de biofilmes cariogênicos.

5 CONCLUSÃO

Ausência funcional dos genes *gtfB*, *lytS* e *dltAD* de *S. mutans* diminui a cariogenicidade de biofilmes formados sobre a superfície dentária e a virulência em infecções sistêmicas; ainda estratégia com miricetina e composto 1771 modula os produtos destes genes, tornando-a uma terapia antibiofilme promissora. Portanto, as conclusões específicas desta pesquisa são:

- A inativação do gene *gtfB*, *lytS* e *dltD* desencadeia menor quantidade de lesões cariosas em modelo animal em superfícies lisas e sulcos, pela ausência dos seus produtos que favorecem a formação do biofilme cariogênico.
- A ausência dos genes *gtfB*, *lytS* e *dltAD* de *S. mutans* diminui a virulência desta espécie em infecção sistêmica in vivo (modelo incipiente - *Galleria mellonella*). A redução na infecção sistêmica pode ser em parte porque a ausência desses genes tornou as cepas com deleção (exceto Δ *gtfB*) mais suscetíveis ao estresse oxidativo, que faz parte do sistema imune inato de *G. mellonella*.
- A aplicação tópica do composto 1771 e da miricetina isoladamente impediu o acúmulo de biofilme de *S. mutans* (in vitro). No entanto, o efeito é mais pronunciado quando foi combinado o composto 1771, a miricetina e o flúor. A estratégia combinada afeta a quantidade dos componentes na matriz, a arquitetura 3D dos biofilmes e a expressão dos genes que codificam exoenzimas que sintetizam EPS.

REFERÊNCIAS*

1. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369(9555): 51-9.
2. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: role of saliva and dental plaque in dynamic process of demineralization and remineralization (Part 1). *J Clin Pediatr Dent*. 2003; 28(1): 47-52.
3. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: enamel structure and caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (Part 2). *J Clin Pediatr Dent*. 2004; 28(2): 119-24.
4. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization and remineralization (Part 3). *J Clin Pediatr Dent*. 2004; 28(3): 203-14.
5. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol*. 1960; 1: 304-20.
6. Newbrun E. *Cariology*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1983.
7. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149(2): 279-94.
8. Manji F, Fejerskov O. Dental caries in developing countries in relationship to the appropriate use of fluorides. *J Dent Res*. 1990; 69(2): 733-41.
9. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 592-7.
10. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015; 94(5): 650-8.
11. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17030.
12. Holmes RD. Tooth brushing frequency and risk of new carious lesions. *Evid Based Dent*. 2016; 17(4): 98-9.
13. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the GBD study 2016. *Lancet*. 2017; 390(10100): 1211-59.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001; 183(12): 3770–83.
15. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. *J Dent Res.* 2006; 85(10): 878-87.
16. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5(10): 1-10.
17. Gronroos L, Saarela M, Matto J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusa S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infect Immun.* 1998; 66(6): 2595-600.
18. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008; 154(11): 3247–55.
19. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1): 69-86.
20. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from "Who are they?" to "What are they doing?". *J Dent Res.* 2015; 94(12): 1628-37.
21. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun.* 1993; 61(9): 3811-7.
22. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr.* 2005; 94(1): 44-50.
23. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13478.
24. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2017; 33(9): 722-40.
25. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Delahunty CM, Yates III JR, Lu B et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathogens.* 2012; 8(4): e1002623.

26. Bowen WH, Schilling K, Giertsen E, Pearson S, Lee SF, Bleiweis A et al. Role of a cell surface associated protein in adherence and dental caries. *Infect Immun*. 1991; 59(12): 4606-9
27. Vacca-Smith AM, Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol*. 1998; 43(2): 103-10.
28. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI et al. Role of glucosyltransferase B in the interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and experimental pellicle formed on hydroxyapatite surface. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(18): 6357-67.
29. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92(12): 1065-73.
30. Inaba H, Amano A. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases - from molecular mechanisms to clinical cases: implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. *J Pharmacol Sci*. 2010; 113(2): 103-9.
31. Freires IA, Avilés-Reyes A, Kitten T, Simpson-Haidaris PJ, Swartz M, Knight PA et al. Heterologous expression of *Streptococcus mutans* Cnm in *Lactococcus lactis* promotes intracellular invasion, adhesion to human cardiac tissues and virulence. *Virulence*. 2017; 8(1): 18-29.
32. Ferro JM, Fonseca AC. Infective endocarditis. *Handb Clin Neurol*. 2014; 119: 75-91.
33. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(9): 623-33.
34. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005; 13(1): 20-6.
35. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Bio*. 2009; 73: 310-47.
36. Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol*. 2009; 191(13): 44097-102.
37. Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*. 2009; 4(6): e5822.
38. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn SJ et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol*. 2014; 196(13): 2355-66.

39. Ahn SJ, Rice KC, Oleas J, Bayles KW, Burne RA. The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate. Virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology*. 2010; 156(10): 3136-47.
40. Ahn SJ, Qu MD, Roberts E, Burne RA, Rice KC. Identification of the *Streptococcus mutans* LytST two-component regulon reveals its contribution to oxidative stress tolerance. *BMC Microbiology*. 2012; 12: 1-12.
41. Kuramitsu HK, Wondrack L, McGuinness M. Interaction of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases with teichoic acids. *Infect Immun*. 1980; 29(2): 376-82.
42. Rölla G, Oppermann RV, Bowen WH, Ciardi JE, Knox KW. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose induced plaque in vivo. *Caries Res*. 1980; 14(4): 235-8.
43. Ellwood DC, Tempest DW. Effects of environment on bacterial wall content and composition. *Adv Microb Physiol*. 1972; 7: 83–116.
44. Brock JH, Reiter B. Chemical and biological properties of extracellular slime produced by *Staphylococcus aureus* grown in high-carbohydrate, high-salt medium. *Infect Immun*. 1976; 13(3): 653–60.
45. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67(4): 686-723.
46. Florez Salamanca EJ, Klein MI. Extracellular matrix influence in *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm. *Mol Oral Microbiol*. 2018; 33(2): 181-93.
47. Tanzer JM, Freedman ML, Fitzgerald RJ. Virulence of mutants defective in glucosyltransferase, dextran mediated aggregation, or dextranase activity. In: Mergenhagen SE, Rosan B, editors. *Molecular basis of oral microbial adhesion*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1985.
48. Gross M, Cramton SE, Gotz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun*. 2001; 69(5): 3423–6.
49. Gründling A, Schneewind O. Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(20): 8478-83.
50. Ahn SJ, Rice KC. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg system through CidB function. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82(20): 6189-203.
51. Nilsson M, Rybtke M, Givskov M. The *dlt* genes play a role in antimicrobial tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 48(3): 298-304.

52. Castillo Pedraza MC, Rosalen PL, de Castilho ARF, Freires IA, de Sales Leite L, Faustoferri RC et al. Inactivation of *Streptococcus mutans* genes *lytST* and *dltAD* impairs its pathogenicity in vivo. *J Oral Microbiol.* 2019; 11(1): 1607505.
53. Spatafora GA, Sheets M, June R, Luyimbazi D, Howard K, Hulbert R et al. Regulated expression of the *Streptococcus mutans* *dlt* genes correlates with intracellular polysaccharide accumulation. *J Bacteriol.* 1999; 181(8): 2363-72.
54. Perry JA, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299(2): 261-6.
55. Kim M, Jeon J, Kim J. *Streptococcus mutans* extracellular DNA levels depend on the number of bacteria in a biofilm. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 13313.
56. Kim M. Characterization of the effects of *Streptococcus mutans* growth conditions on eDNA release. Proceedings of the 32nd Asia Pacific Dental and Oral Health Congress; 2018 jul 23 – 24; Sydney, Australia. [acesso em 2019 jul 14]. Disponível em: <https://www.longdom.org/proceedings/characterization-of-the-effects-of-streptococcus-mutans-growth-conditions-on-edna-release-43070.html>.
57. May JJ, Finking R, Wiegeshoff F, Weber TT, Bandur N, Koert U et al. Inhibition of the D-alanine: D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall. *FEBS J.* 2005; 272(12): 2993-3003.
58. Mazda Y, Kawada-Matsuo M, Kanbara K, Oogai Y, Shibata Y, Yamashita Y et al. Association of CiaRH with resistance of *Streptococcus mutans* to antimicrobial peptides in biofilms. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27(2): 124-35.
59. Bowen WH, Hewitt MJ. Effect of fluoride on extracellular polysaccharide production by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 1974; 53(3): 627-29.
60. Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev* 2003, 26(5): 1-18.
61. Jeon JG, Klein MI, Xiao J, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 228.
62. Guo L, Hu W, He X, Lux R, McLean J, Shi W. Investigating acid production by *Streptococcus mutans* with a surface-displayed pH-sensitive green fluorescent protein. *PLoS One* 2013; 8(2): e57182.