



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



MIDIAN CLARA CASTILLO PEDRAZA

**FUNÇÃO DE DNA EXTRACELULAR E DE ÁCIDO LIPOTEICÓICO NAS
PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR
DE BIOFILMES CARIOGÊNICOS**

Araraquara

2016



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



MIDIAN CLARA CASTILLO PEDRAZA

**FUNÇÃO DE DNA EXTRACELULAR E DE ÁCIDO LIPOTEICÓICO NAS
PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR
DE BIOFILMES CARIOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador:

Profa. Dra. MARLISE INÊZ KLEIN

Araraquara

2016

Castillo Pedraza, Midian Clara

Função de DNA extracelular e de ácido lipoteicóico nas propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular de biofilmes cariogênicos / Midian Clara Castillo Pedraza. -- Araraquara: [s.n.], 2016.

105 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

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

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

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

MIDIAN CLARA CASTILLO PEDRAZA

**FUNÇÃO DE DNA EXTRACELULAR E DE ÁCIDO LIPOTEICÓICO NAS
PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR
DE BIOFILMES CARIOGÊNICOS**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Profa. Dra. MARLISE INÊZ KLEIN

Pesquisador III, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade De Odontologia De Araraquara, UNESP.

2º Examinador: Profa. Dra. CRISTIANE DUQUE

Professor Assistente Doutor, do Departamento de Odontopediatria, Faculdade Odontologia de Araçatuba, UNESP.

3º Examinador: Profe. Dr. EWERTON GARCIA DE OLIVEIRA MIMA

Professor Assistente Doutor, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

Araraquara, 12 de agosto de 2016.

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)

2014/2016 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado

Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

2006/2012 Curso de Graduação em Odontologia

Universidad del Magdalena, Santa Marta- Colômbia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida. Pela força que Ele mesmo gera em mim a cada novo dia e por me ajudar a concluir mais uma etapa importante da minha carreira. Sem Ele eu não teria chegado até aqui. Eu não tenho sorte, eu sou abençoada por Deus.

Aos meus pais, Alberto e Eunice, pela confiança depositada, por todo o apoio e incentivo, pela educação, cuidado, amor e conselhos ao longo de todos esses anos na minha vida. Pelas horas em que chorei e nas horas em que sorri, vocês sempre estavam comigo. Vocês fizeram de mim a pessoa que sou hoje e eu só tenho a agradecer. De longe eu dedico meus sucessos à vocês.

À minha avó, a grande Ana Naranjo, por toda a ternura e amor, que meu Deus lhe dê saúde e vida, para que possa ver-me alcançar meus objetivos. Saudade de você Naranjita.

Ao meu namorado Jorge H., pelo apoio, carinho, paciência, amor e preocupação que sempre teve comigo por quase uma década.

A toda minha família Castillo - Pedraza, e aos que mais perto de mim estão (Beatriz, Anyela, Daniela), por acreditar em mim, meu sucesso é de vocês.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marlise Inêz Klein, pela oportunidade e confiança em mim depositada, por toda a PACIÊNCIA e pelas orientações ao longo desse trabalho, estou muito grata com Deus pela oportunidade de ter à doutora na minha vida acadêmica.

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

Aos meus queridos amigos em Brasil (Cristiane, Danny, Jeffersson, Juventina L, Kassia, Maria I, Natali e Uxua) vocês marcaram minha vida em Araraquara de uma maneira muito especial, e tornaram minha estadia nessa cidade muito agradável. Agradeço imensamente pela amizade e carinho.

A minha família de Ribeirão Preto, Prof. Alessandro Martins e minha mãe Bianca Martins, obrigada por abrir a porta da sua casa e me fazer sentir como se eu fosse da família, pessoas como vocês nunca sairão do meu coração. Amarei vocês sempre.

A todos os meus amigos, de perto e de longe, aos mais novos e aos não tão novos assim.

Às pessoas voluntárias que me ajudaram para coletar a saliva, fico muito grata pelo apoio de vocês.

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

Aos professores: Dra. Denise Spolidório (Laboratório de Microbiologia e biologia molecular, FOAr-UNESP); Dr. Ewerton Garcia (Laboratório de Microbiologia aplicada, FOAr-UNESP), que gentilmente abriaram as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte deste trabalho.

Ao Dr. Robert G. Quivey (*Center for Oral Biology, University of Rochester*) quem forneceu as cepas mutantes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro nas modalidades bolsa de estudo (CAPES e FAPESP 2014/21355-4) e auxílio à pesquisa (FAPESP 2014/05423-0).

Castillo MC. Função de DNA extracelular e de ácido lipoteicóico nas propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular de biofilmes cariogênicos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

A cárie dentária é uma doença dependente de biofilme, da dieta e fatores de hospedeiro. O biofilme é uma comunidade microbiana dinâmica, coberta pela matriz extracelular (MEC). Em biofilmes cariogênicos, a MEC rica em exopolissacarídeos proporciona microambientes ácidos, causando desmineralização do esmalte. Este estudo avaliou a função de DNA extracelular (eDNA) e ácido lipoteicóico (ALT) nas propriedades estruturais e funcionais da MEC de biofilmes cariogênicos. Biofilmes monoespécie de *Streptococcus mutans* UA159 (cepa parental ou mutantes *knockout*) e mistos (UA159 cepa parental ou mutantes, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 e *Streptococcus gordonii* DL-1) foram formados em discos de hidroxiapatita com película salivar, em meio com saliva e 0,1% sacarose, alternado com 0,5% sacarose+1% amido (37°C/5% CO₂). O pH do meio de cultura foi verificado a cada troca. Para modular componentes da MEC foram utilizadas cepas mutantes de *S. mutans* para os genes *lytTS* (Δ SMu.525 e Δ SMu.526 - eDNA), operon *dltABCD* (Δ SMu.1538 e Δ SMu.1541 - ALT) e *gtfB* (exopolissacarídeos insolúveis). A população microbiana foi avaliada longitudinalmente. Nas idades do biofilme 67 e 115 h, os biofilmes foram processados para avaliar a biomassa, as proteínas totais, e os componentes da matriz: eDNA, ALT, proteínas e exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis (ASP) em água. Os dados foram analisados com ANOVA um critério e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Na presença de 0,5% sacarose+1% amido, o pH do meio tornou-se mais ácido. Nos estágios iniciais dos biofilmes mistos, *S. gordonii* foi predominante ($p<0,05$); a proporção das três espécies foi similar em 67 h, e com o passar do tempo *S. mutans* se tornou majoritário ($p<0,05$), independentemente da modulação dos componentes da MEC. A biomassa e as proteínas totais dos biofilmes monoespécie e mistos, geralmente aumentaram significativamente com o tempo ($p<0,05$). Porém, detectou-se diferentes quantidades de componentes da matriz, dependendo do gene inativado e do tipo de biofilme. As cepas Δ SMu.525 e Δ SMu.526 apresentaram as maiores quantidades de eDNA na MEC em biofilme monoespécie nas duas fases de formação ($p<0,05$), mas no biofilme misto apenas na idade 115 h ($p<0,05$). Portanto, os genes *lytTS* modulam eDNA na MEC de biofilmes cariogênicos. ALT foi detectado na MEC de todos os biofilmes, ocorrendo aumento significativo com a idade em biofilmes monoespécie das cepas Δ SMu.1538 e Δ SMu.1541 (vs. UA159; $p<0,05$). Houve variação na quantidade de WSP e ASP na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos. Em biofilmes com a cepa *gtfB* existe menos WSP nas duas idades em monoespécie ($p<0,05$), e em mistos não houve variação ($p>0,05$). Ocorre menos WSP na MEC de biofilmes monoespécie de Δ SMu.525 na idade 115 h (vs. UA159). A quantidade de ASP no biofilme misto com 115 h foi menor para a cepa *gtfB* em relação aos genes do operon *dltABCD* ($p<0,05$). Finalmente, o conteúdo de proteínas na MEC foi menor para a cepa *gtfB* versus UA159 e Δ SMu.1541 em biofilme

misto de 115 h ($p < 0,05$). Portanto, eDNA, ALT e exopolissacarídeos atuando em conjunto, contribuíram para a aderência de microrganismos, formação e maturação de biofilmes cariogênicos.

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

Castillo MC. Role of extracellular DNA and lipoteichoic acid in the structural and the functional properties of the matrix of cariogenic biofilm [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Dental caries is a disease dependent of biofilm, diet and host factors. Biofilm is a dynamic microbial community enmeshed by an extracellular matrix (ECM). In cariogenic biofilms, the ECM rich in exopolysaccharides provide acidic microenvironments that cause demineralization of enamel. The present study evaluated the role of extracellular DNA (eDNA) and lipoteichoic acid (LTA) in the structural and functional properties of the matrix of cariogenic biofilm. Single-species biofilms of *Streptococcus mutans* UA159 (parental or knockout strains) and mixed-species (UA159 parental or mutant strains, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 and *Streptococcus gordonii* DL-1) were grown onto saliva-coated hydroxyapatite discs, in medium with saliva and 0.1% sucrose, alternating with 0.5% sucrose + 1% starch (37°C / 5%CO₂). The pH of spent media was verified at each medium change. The *S. mutans* knockout mutant strains of genes *lytTS* (Δ SMu.525 and Δ SMu.526 - eDNA), operon *dltABCD* (Δ SMu.1538 and Δ SMu.1541 - LTA) and *gtfB* (insoluble exopolysaccharide) were used to modulate ECM components. The microbial population was evaluated longitudinally. At 67 and 115 h, biofilms were processed to assess biomass, total protein and ECM components: eDNA, LTA, soluble proteins, and water soluble (WSP) and insoluble (ASP) exopolysaccharides. The data were analyzed by ANOVA one-way and Tukey test ($\alpha=0.05$). In the presence of 0.5% sucrose + 1% starch the pH of spent media became more acid. During the initial stages of mixed-species biofilm development, *S. gordonii* prevail ($p<0.05$); the proportion of the three species was similar at 67 h, and *S. mutans* becomes the dominant species over time ($p<0.05$), independently of ECM components modulation. The biomass and the total protein content of single- and mixed-species biofilms usually showed significant increases over time ($p<0.05$). However, distinct amounts of ECM components were detected, depending on the gene that was inactivated and on the biofilm type. The strains Δ SMu.525 and Δ SMu.526 showed the highest amounts of eDNA in ECM of single-species biofilms in both ages ($p<0.05$), but in mixed-species biofilms only at 115 h ($p<0.05$). Therefore, the genes *lytTS* modulate eDNA in the ECM of cariogenic biofilms. LTA was detected in the matrix of all biofilms, significantly increasing as the single-species biofilms of Δ SMu.1538 and Δ SMu.1541 aged (vs. UA159; $p<0.05$). The amount of WSP and ASP varied in both biofilm types. The strain *gtfB* formed single-species biofilms with less WSP in the ECM at 67 and 115 h ($p<0.05$), but in mixed-species biofilms no significant change occurred ($p>0.05$). There is less WPS in the matrix of single-species biofilms formed by mutant Δ SMu.525 at 115 h (vs. UA159). The amount of ASP in mixed-species biofilm with age 115 h was lower for *gtfB* strain compared to *dltABCD* operon genes ($p<0.05$). Finally, the amount of proteins in the ECM was lower only for strain *gtfB* versus UA159 and SMu.1541 in mixed-species biofilm at 115 h ($p<0.05$). Therefore, eDNA, ALT and ESP working

together contribute to the microbial adhesion, formation and maturation of cariogenic biofilms.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fatores que interagem e contribuem com o desenvolvimento da cárie.

Resumo dos fatores que atuam em conjunto no desenvolvimento da doença cárie. Em branco são os fatores que estão diretamente envolvidos, em azul os fatores ambientais da cavidade bucal, e em laranja estão fatores pessoais. Modificado de Manji e Fejerskov⁷¹, 1990; Selwitz et al.¹⁰⁴, 2007.

Figura 2 - Desenho experimental do modelo de biofilme utilizado. Formação de biofilmes mistos com três espécies: *Streptococcus mutans* (cepa parental ou mutantes), *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus gordonii*, para o biofilme monoespécies foram utilizadas apenas as cepas de *S. mutans* (cepa parental ou mutantes). HA: hidroxiapatita. Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 - Esquema do processamento de biofilmes para análises microbiológica e bioquímicas. Elaboração própria.

Figura 4 - Imagem representativa de morfologia de colônias das três espécies recuperadas de biofilmes mistos. Biofilmes mistos, em placa de ágar sangue após incubação (48h/ 5% CO₂), para quantificar as espécies em diferentes idades. As espécies são facilmente diferenciáveis: *S. mutans* apresenta colônia branca rugosa, especialmente na sua borda; *A. naeslundii* apresenta colônia branca com uma borda lisa; e finalmente *S. gordonii* apresenta colônia amarelada com um anel bem definido em torno da mesma. Elaboração própria.

Figura 5 - Fluxograma para processamento dos biofilmes para análises da população microbiana e bioquímicas. Elaboração própria.

Figura 6 - Esquema para quantificação do peso seco insolúvel do biofilme. 500 µL de biofilme adicionados em “barcos” de alumínio, foram pesados utilizando balança analítica (SHIMADZU - série AUW220D). Fonte: Elaboração própria.

Figura 7 - Desenho da curva padrão para quantificação das proteínas no biofilme. **A.** 20 µL de BSA a 200 mg/mL mais 1,980 µL de água foram misturados em um microtubo para elaboração da solução padrão; **B.** construção dos pontos da curva com a solução padrão de BSA e H₂O. Vol.: volume. BSA: *bovine serum albumin*. Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Curva padrão e escala colorimétrica para proteínas, usando o método de Bradford. **A. Curva padrão para proteínas:** Análise dos dados com D.O._{595nm} onde observa-se correlação linear positiva. **B. Ilustração da escala colorimétrica:** Teste de Bradford. *Slope*: 0,020-0,026. A coloração azul na placa denota maior concentração de proteína. BSA: *bovine serum albumin*. D.O.: densidade óptica. Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Quantificação de eDNA. Utilizando o nanoespectrofotômetro (DS-11+, Denovix), quantificou-se o eDNA encontrado na matriz dos biofilmes, adicionando 1,5 µL da amostra e leitura a 260 nm. Leituras realizadas em duplicata. O *Blank* utilizado foi TE. Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 - Minibeadbeater - Biospec Products. Os tubos com as amostras estão posicionados no suporte de amostras (acrílico fumê – indicado pela seta na cor laranja), que é posicionado no eixo metálico (indicado pela seta na cor vermelha), para homogeneização da amostra e disrupção mecânica das células. Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 - Extração de ALT da matriz de biofilmes cariogênicos. Uma alíquota de 3 mL foi misturada com 150 µL de TCA (Solução final com 5% TCA), os tubos foram deixados incubados durante 18 h a 22°C (homogeneizador); em seguida foram realizadas duas centrifugações (6500 g / 30 min, 4°C; 5810R, Eppendorf); adicionando éter e acetona aos sobrenadantes respectivamente. As amostras foram incubadas por 24 h a 4°C e finalmente centrifugadas (6500 g / 30 min, 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf), o *pellet* obtido foi secado e H₂O foi adicionada, ficando pronto para a quantificação via ELISA. Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Curva padrão para exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis em água (ASP). **A. Exemplo de curva padrão para WSP e ASP:** Análise dos dados com D.O._{490nm} onde observa-se correlação linear positiva. **B. Escala colorimétrica:** Ensaio fenol-ácido sulfúrico, *slope*: 0,048-0,051. Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 - pH dos meios de cultura de biofilmes monoespécie e mistos. Do lado esquerdo do gráfico estão os dados dos biofilmes monoespécies e do lado direito do gráfico estão os dados dos biofilmes mistos. As idades avaliadas foram 19, 29, 43, 53, 67, 77, 91, 101 e 115 h. Observar-se o pH mais ácido nas idades 43, 67, 91 e 115 h

para todas as cepas de *S. mutans* avaliadas—parental e mutantes (* $p < 0,05$, ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 - Proporção das três espécies em biofilmes mistos em diferentes idades do biofilme. Os dados apresentados são de pelo menos três experimentos, realizados em duplicata. Nas idades 29, 43, 53 h a espécie *S. gordonii* foi dominante, não houve diferenças na idade 67 h, em 77 e 91 h *A. naeslundii* foi significativamente menor vs. *S. gordonii*, já em 101 h *S. gordonii* e *A. naeslundii* foram menores do que *S. mutans*. Na idade de 115 h a cepa $\Delta gtfB$ foi maior vs. *S. gordonii*. O asterisco * denota $p < 0,05$, usando ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey, na comparação entre as três espécies em cada biofilme misto em uma determinada idade do biofilme. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Dinâmica da população das diferentes cepas testadas em várias fases de formação de biofilmes mistos. Análise longitudinal da população das diferentes espécies. Fonte: Elaboração própria.

Figura 16 - Valores de UFC nos biofilmes mistos com 67 h (A) e 115 h (B). Não existe diferença nos valores de UFC detectados para todas as cepas estudadas na idade de 67 h (A) ($p > 0,05$). Na idade 115 h (B) são representados, UFC de *S. mutans* e de *S. gordonii* nos biofilmes mistos formados pela cepa parental UA159 e as mutantes *knockout*; (#)nesses biofilmes existe diferença apenas nos valores de UFC detectados para $\Delta gtfB$ vs. UA159; além, (*)houve uma diminuição ao passar do tempo 67 a 115 h detectado nas cepas $\Delta gtfB$, $\Delta dltA$ e $\Delta dltD$. Os dados representados são médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e # $p < 0,05$; ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 17 - Valores de UFC nos biofilmes monoespécie com 67 h e 115 h. Em biofilmes monoespécie com 67 h (representados com a cor preta): (#)Existe diferença nos valores de UFC detectados para $\Delta gtfB$ vs. toda as cepas *S. mutans* (* $p < 0,05$). Em branco observa-se a idade 115 h: (##)Onde existe diferença de UFC paraa cepa $\Delta gtfB$ vs. UA159 e $\Delta SMu.525$; ainda, (+)observa-se uma disminuição de UFC de 67 a 115 h para a cepa $\Delta SMu.525$ (# e +: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de

Tukey). Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Fonte: Elaboração própria.

Figura 18 - Biomassa (peso seco) insolúvel em biofilmes monoespécie e mistos

Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67h e 115h. (*) Observa-se um aumento significativo em todas as cepas de 67 a 115 h para os biofilmes monoespécie; o mesmo acontece no biofilme misto, exceto para a cepa $\Delta SMu.525$. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* $p < 0,05$, ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 19 - Proteínas na porção insolúvel de biofilmes monoespécie e mistos.

Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. Nos biofilmes monoespécie: (#) biofilme formado pela cepa $\Delta gtfB$ apresenta menor quantidade de proteína na idade 115 h (vs. as cepas de *S. mutans* $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$); além, (*) houve um aumento significativo de 67 a 115 h nas cepas $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$. Em biofilmes mistos: (#) a menor quantidade de proteína foi detectada em biofilmes formados por $\Delta gtfB$ na idade 115 h vs. $\Delta SMu.1538$ apenas. Os dados representados são médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - eDNA na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos.

Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. Para biofilmes monoespécie, (*) houve uma diferença de eDNA entre a cepa parental, sendo 115 h menor que 67 h; (#) as cepas $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$ apresentaram maiores quantidades de eDNA que as cepas $\Delta gtfB$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$ em cada fase testada, (+) $\Delta SMu.526$ (115 h) apresentou maior quantidade vs. a cepa parental (115 h). (*) No biofilme misto houve um aumento entre as idades 67 a 115h nas cepas: $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$. (#) Na idade 115 h, em biofilmes mistos $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$ também apresentaram maior quantidade de eDNA que as demais cepas testadas. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (*, + e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 21 - ALT na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos. Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de 67 para 115 h para a cepa parental em ambos biofilmes monoespécie e mistos. (#) Em biofilmes monoespécie as cepas $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$ apresentam quantidades significativamente maiores de ALT do que a cepa parental na idade 67 h. Em biofilmes mistos não houve diferenças significativas nas duas fases de formação; além, (*) houve um aumento significativo de 67 para 115 h na cepa $\Delta SMu.1541$. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 22 - Exopolissacarídeos solúveis na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos. Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de WSP em todas as cepas de biofilmes mistos e monoespécie ao passar de 67 h para 115 h. Biofilmes monoespécies: (#) Nas idades 67 e 115 h, $\Delta gtfB$ foi a cepa com menor conteúdo de WSP; (+) em 115 h, o biofilme formado por $\Delta SMu.525$ apresentou também, menor quantidade de WSP *versus* a cepa parental. Em biofilme misto: (#) $\Delta gtfB$ foi a cepa com menor conteúdo de WSP na idade 67 h. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (*, + e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Exopolissacarídeos insolúveis na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos. Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de 67 para 115 h nos biofilmes mistos e monoespécie. Em biofilme monoespécie: (#) Na idade 115 h, $\Delta gtfB$ foi a cepa com menor quantidade de ASP *versus* $\Delta SMu.526$. Em biofilme misto: (#) Na idade 115 h, $\Delta gtfB$ foi a cepa com menor quantidade de ASP *versus* as cepas parental UA159, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura 24 - Proteínas solúveis na MEC recuperadas de biofilmes monoespécie e mistos. Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de 67 para 115 h para as cepas $\Delta SMu.525$,

$\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$ em biofilmes monoespécie. (#)Na idade de 115 h de biofilmes monoespécie, houve uma diminuição de proteínas para $\Delta gtfB$ vs. todas as cepas exceto $\Delta SMu.526$. (#)Na idade 115 h de biofilmes mistos, $\Delta gtfB$ apresentou a menor quantidade de proteínas na MEC vs. todos os outros biofilmes com a mesma idade. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Fonte: Elaboração própria.

Figura - 25 Arquitetura 3D de biofilmes monoespécie. Esta figura exibe imagens representativas de renderizações 3D dos biofilmes monoespécie formados por *S. mutans* cepas parentais (UA159) e mutantes ($\Delta gtfB$, $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.526$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$) com idade 115 h. A cor verde representa o conteúdo bacteriano em cada biofilme, enquanto que a cor vermelha representa ESP na matriz extracelular. Elaboração própria.

QUADROS

Quadro 1 - Características das cepas utilizada no biofilme misto. Fonte: Jakubovics et al.⁴⁸, (2013).

Quadro 2 - Cepas de *S. mutans* utilizadas no estudo. * nomenclatura utilizada pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information). ** nomenclatura utilizada pelo Los Alamos Laboratories. *Erm*: 5 µg/mL de eritromicina em placas de BHI ágar. *Kan*: 1 mg/mL de kanamicina em placas de BHI ágar. Fonte: Chatfield et al.¹⁴, (2005); Quivey et al.⁹⁴, (2015).

Quadro 3 - Grupos experimentais. *Foram desenvolvidos seis grupos experimentais para biofilmes monoespécie e mistos. Os biofilmes mistos com idade 67 h foram processados em cinco ocasiões e com idade 115 h em três ocasiões; já para biofilmes monoespécie foram feitos em três ocasiões nas duas idades de formação. **Todos os biofilmes foram realizados em duplicata. Fonte: Elaboração própria.

TABELAS

Tabela 1 - Curva padrão de glicose para quantificação de WSP. Elaboração própria.

Tabela 2 - Curva padrão de glicose para quantificação de ASP. Elaboração própria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. naeslundii – *Actinomyces naeslundii*

ALT – Ácidos lipoteicóicos

ASP – Exopolissacarídeos insolúveis em água (mas solúveis em álcali)

BHI – *Brain Heart Infusion*

BSA – *Bovine serum albumin*

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CO₂ – Dióxido de carbono

D.O. – Densidade Óptica

eDNA – DNA extracelular

EPS – Exopolissacarídeos

Ftfs – Frutossiltransferases

g – Gramas

Gtfs – Glicosiltransferases

h – Horas

HA – Hidroxiapatita

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

i.e. – isto é

KCl – Cloreto de potássio

KPO₄ – fosfato de potássio

M – Moles

MEC – Matriz extracelular

mg – Miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitros

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

Rpm – Rotações por minutos

S. gordonii – *Streptococcus gordonii*

sHA – Hidroxiapatita coberta com película salivar

S. mutans – *Streptococcus mutans*

TCA – ácido tricloroacético

TE – Tris-EDTA; pH 8,0

TY – *Tryptone + Yeast Extract*

UFC – Unidades formadoras de colônias

V/V – Volume sobre volume

W – Watts

WSP – Exopolissacarídeos solúveis em água

μL – Microlitros

nm – nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Cárie dentária	26
2.2 Microrganismos do biofilme dentária.....	28
2.3 A matriz extracelular de biofilme.....	32
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 Formação de biofilme para análise da matriz extracelular e avaliação da dinâmica populacional	37
4.1.1 Processamentos para preparo dos biofilmes	39
4.2 Processamento dos biofilmes, para análise populacional e dos componentes da matriz extracelular.....	43
4.2.1 Peso seco insolúvel dos biofilmes	46
4.2.2 Quantificação de proteínas totais do biofilme e da matriz extracelular.....	47
4.2.3 Quantificação de eDNA na matriz extracelular.....	49
4.2.4 Detecção e quantificação de ALT na matriz extracelular.....	50
4.2.5 Exopolissacarídeos solúveis em água (WSP) na matriz extracelular.....	57
4.2.7 Exopolissacarídeos insolúveis em água (ASP) na matriz extracelular.....	58
4.3 Análise da estrutura 3D de biofilmes usando microscopia confocal	61
4.4 Análise Estatística	62
5 RESULTADOS	63
5.1 Análise de biofilmes monoespécie e mistos	63
5.1.1 pH do meio de cultura, de biofilmes monoespécie e mistos	63

5.1.2 População microbiana dos biofilmes	64
5.1.3 Peso seco insolúvel - Biomassa nas duas fases de formação	69
5.1.4 Proteínas do biofilme em duas fases de formação	69
5.2 Análise dos componentes da matriz extracelular de biofilmes monoespécie e mistos.....	70
5.2.1 eDNA extracelular em duas fases de formação.....	70
5.2.2 Ácidos lipoteicóicos em duas fases de formação	71
5.2.3 Exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis (ASP) na MEC em duas fases de formação.....	72
5.2.4 Proteínas solúveis dois fases de formação	74
5.3 Estrutura 3D dos biofilmes.....	75
6 DISCUSSÃO.....	77
6.1 Análise de biofilmes monoespécie e mistos	77
6.1.1 pH do meio de cultura, de biofilmes monoespécie e mistos	77
6.1.2 População microbiana dos biofilmes	78
6.1.3 Peso seco insolúvel - Biomassa nas duas fases de formação	79
6.1.4 Proteínas do biofilme em duas fases de formação	79
6.2 Análise dos componentes da matriz extracelular de biofilmes monoespécie e mistos.....	80
6.2.1 eDNA extracelular em duas fases de formação.....	80
6.2.2 Ácidos lipoteicóicos em duas fases de formação	80
6.2.3 Exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis (ASP) na MEC em duas fases de formação.....	81
6.2.4 Proteínas solúveis dois fases de formação	81
6.3 Estrutura 3D dos biofilmes.....	82

7 CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE A.....	94
APÊNDICE B.....	96
APÊNDICE C	98
APÊNDICE D.....	100
APÊNDICE E.....	102
APÊNDICE F.....	103
ANEXO A.....	104

1 INTRODUÇÃO

É aceito e estabelecido mundialmente que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, e dependente de biofilme (Fitzgerald, et al.³⁰, 1960; Keyes et al.⁵¹, 1960; Selwitz et al.¹⁰⁴, 2007; Bowen¹⁰, 2015). A interação de fatores de microrganismos e da dieta sobre os dentes, determinam a ocorrência da doença cárie (Keyes⁵¹, 1960).

Biofilmes são comunidades de células microbianas, altamente dinâmicas estruturadas e organizadas, que se encontram cobertas e imersas dentro de uma matriz extracelular (MEC) tridimensional (3D) (Branda et al.¹², 2005; Flemming, Wingender³¹, 2010). A matriz é essencial para a existência do biofilme, uma vez que a mesma atua como um esqueleto de suporte, e concomitantemente funciona como uma barreira que limita a difusão (de íons, metabólitos microbianos, nutrientes e antimicrobianos), fornecendo proteção aos microrganismos mediante a criação de portos seguros onde os patógenos prosperam (Stewart, Franklin¹¹, 2008; Xiao et al.¹²³, 2012; Klein et al.⁵⁶, 2013). Em biofilmes cariogênicos, essa limitação da difusão dificulta a ação da saliva para neutralizar os ácidos produzidos durante a fermentação de carboidratos da dieta, causando dissolução ácida do esmalte dentário (*i.e.*, lesões de cárie).

Em biofilmes cariogênicos, os exopolissacarídeos (EPS) são os componentes principais na construção da MEC (Paes Leme et al.⁸⁶, 2006; Bowen, Koo⁸, 2011), mas DNA extracelular (eDNA) e ácidos lipoteicóicos (ALT) são detectados em quantidades elevadas nesses biofilmes (Jacques et al.⁴⁶, 1979; Rölla et al.^{98,99}, 1980, 1983; Ciardi et al.¹⁸, 1981; Hogg et al.⁴³, 1997). Os EPS sintetizados *in situ* permitem a aderência e acúmulo dos microrganismos nos dentes (Bowen, Koo⁸, 1991; Vacca-Smith, Bowen¹²⁰, 1998; Banas, Vickerman³, 2003; Hannig et al.⁴⁰, 2008). Com o passar do tempo, os polissacarídeos colaboram na formação da matriz 3D fornecendo um ambiente com difusão limitada (Melvaer et al.⁷⁸, 1972; Xiao et al.¹²³, 2012).

A espécie *Streptococcus mutans* coordena a construção do biofilme cariogênico na presença de sacarose e de amido da dieta, dando início à patogênese da cárie dentária (Firestone et al.²⁹, 1982; Marsh^{74, 75}, 1994, 2003). *S. mutans* é responsável pela síntese de EPS (glicanos e frutanos) pelas suas exoenzimas glicosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftfs) (Fu, Robyt³², 1991; Vacca-Smith

et al.¹²⁰, 1998; Bowen, Koo⁸, 2011). Concomitante à formação de EPS, a liberação de eDNA (1-7 µg/ml) e ALT (até 1 mg/ml) por *S. mutans* é induzida por sacarose, amido e acidez elevada (Ciardi et al.^{17, 18}, 1977, 1981; Jacque et al.⁴⁶, 1979; Hardy et al.⁴¹, 1981; Rölla et al.⁹⁹, 1983; Klein et al.⁵³, 2010). Porém, as funções de eDNA e ALT na construção da MEC são pouco conhecidas, o que torna o estudo desse processo claramente relevante. Entender como esses componentes interagem pode ser útil na compreensão da fisiologia do biofilme e no desenvolvimento de terapias direcionadas para prevenir e remover biofilmes cariogênicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cárie dentária

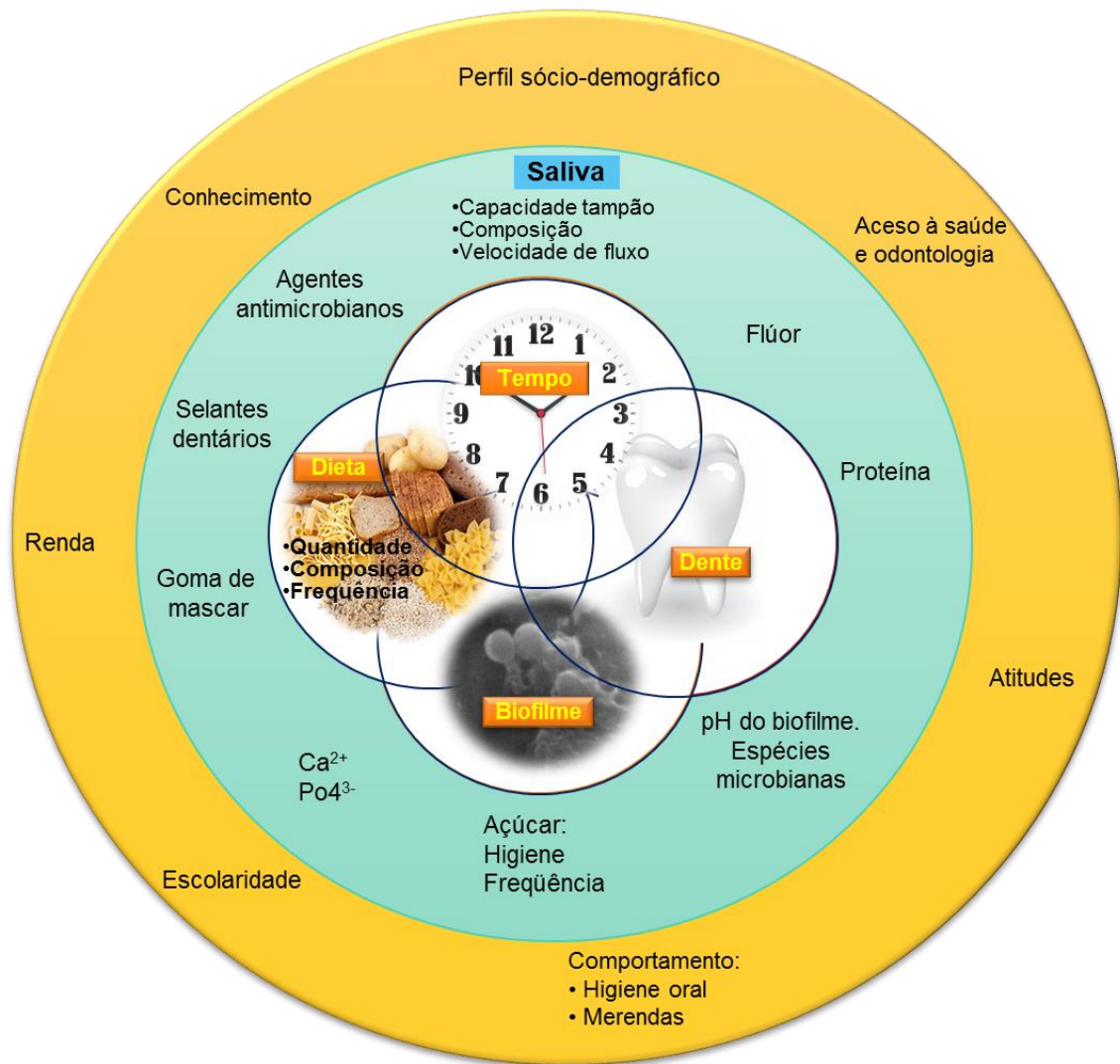
A cárie dentária continua sendo um problema de saúde pública mundial, afetando crianças e adultos (Marcenes et al.⁷³, 2013; Kassebaum et al.⁵⁰, 2015). Os indivíduos são suscetíveis ao desenvolvimento dessa doença ao longo de suas vidas, como demonstrado pela ocorrência de picos de manifestação nas idades 6, 25 e 70 anos (Kassebaum et al.⁵⁰, 2015). A doença se desenvolve em qualquer parte mineralizada do dente, resultando na perda dos minerais e da superfície dentária (Weyne et al.¹²², 1989). Essa destruição localizada de tecidos duros pode surgir na infância sendo denominada cárie precoce da infância, que afeta os dentes decíduos de crianças e bebês.

O conceito de cárie é embasado na interação de fatores como dente suscetível (que é o substrato), dieta e microrganismos em biofilmes fortemente aderidos sobre a superfície do dente (Marsh⁷⁵, 2003). Os fatores envolvidos na ocorrência da doença cárie foram ilustrados no diagrama de Keyes⁵¹ (1960), e mais tarde por Newbrun⁸³ (1983). Assim, a Tríade de Keyes, foi o modelo explicativo para a cárie dentária mais representativo, modificado por Newbrun, que inclui o tempo como fator etiológico, que deve agir simultaneamente com os outros fatores para o desenvolvimento da lesão de cárie (Costa et al.¹⁹, 2012) (Figura 1). Portanto, a cárie é produto de interações de fatores, pois nenhum fator isolado pode ser responsável pela doença. Por exemplo, o biofilme é primordial na ocorrência da cárie, mas só a presença deste não resulta na lesão cariiosa (Manji, Fejerskov⁷¹, 1990; Selwitz et al.¹⁰⁴, 2007), as condições devem ser favoráveis para que o biofilme se torne cariogênico, especialmente a dieta rica em açúcares.

Assim, na cárie dentária acontece a desmineralização do esmalte devido aos baixos valores de pH, produzido principalmente pelo metabolismo de carboidratos da dieta (diariamente consumida), pelos microrganismos associados às superfícies dos dentes em um biofilme patogênico. Nesse sentido, é consagrado que a remoção mecânica do biofilme com escovação diária (mínimo três vezes ao dia), o uso de fio dentária, além da aplicação do flúor e visitas ao cirurgião dentista pelo menos cada 6 meses para uma profilaxia dentária, auxiliam na prevenção dessa doença. Mesmo

com este conhecimento, essa doença persiste como um problema mundial e é o principal fator relacionado com a perda da dentição (Marcenes et al.⁷³, 2013; Kassebaum et al.⁵⁰, 2015).

Figura 1 - Fatores que interagem e contribuem com o desenvolvimento da cárie



Resumo dos fatores que atuam em conjunto no desenvolvimento da doença cárie. Em branco são os fatores que estão diretamente envolvidos, em azul os fatores ambientais da cavidade bucal, e em laranja estão fatores pessoais.

Fonte: Modificado de Manji e Fejerskov⁷¹, 1990; Selwitz et al.¹⁰⁴, 2007.

2.2 Microrganismos do biofilme dentário

Os microrganismos presentes no biofilme dentário são fundamentais no estabelecimento de uma microbiota virulenta ou não, e para o desenvolvimento de lesões de cárie; assim, um biofilme que contém maior número de microrganismos que sobrevivem em meio ácido (acidúricos) e que produzem ácido (acidogênicos) será mais virulento e provocará a perda de minerais da superfície do esmalte (desmineralização) (Marsh⁷⁴, 1994; Paes Leme et al.⁸⁶, 2006). A microbiota se torna complexa nas crianças com mais de 2 anos de idade, devido à erupção dos dentes. Neste período, há um aumento da quantidade de microrganismos encontrados no biofilme, tornando-se um ambiente propício para a colonização de bactérias cariogênicas (Mattos Graner et al.⁷⁶, 2014; Sampaio, Monteiro¹⁰⁰, 2014).

Os dentes estão constantemente cobertos por uma película salivar, composta por 99% água e 1% de compostos orgânicos e inorgânicos, principalmente por: enzimas, minerais, aminoácidos, proteínas do tipo amilase, glicoproteínas salivares, glicosiltransferases, lipídios, fosfoproteínas, lisozimas, peroxidases, IgA, IgG, proteínas ricas em prolina, mucina e produtos bacterianos, como as Gtfs (Oppenheim, et al.⁸⁵, 2007; Siqueira, et al.¹⁰⁵, 2007; Levine⁶⁵, 2011; Zimmerman, et al.¹²⁷, 2013; Guo, Shi³⁷, 2013). Na microbiota oral, foram identificadas mais de 500 espécies diferentes de microrganismos vivendo em comunidades na cavidade oral humana (Paster et al.⁹⁰, 2001), sendo que 20% das bactérias orais são do gênero *Streptococcus* (Schachtele et al.¹⁰², 2007). Embora a microbiota oral seja complexa, a espécie *Streptococcus mutans* desempenha um papel importante na etapa de transição da forma não-patogênica para biofilmes altamente cariogênicos (Paes Leme et al.⁸⁶, 2006).

A formação do biofilme envolve três principais estágios: 1- Adsorção específica de proteínas salivares sobre a superfície dentária; 2- A chegada dos colonizadores iniciais (e.g., *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces spp.*); 3- A chegada dos colonizadores secundários e a maturação da placa (Fejerskov²⁸, 2004). Os colonizadores primários são capazes de se aderir a uma superfície (geralmente em presença de proteína ou outros componentes orgânicos) como resposta imediata (Nobbs et al.⁸⁴, 2009; Kuboniwa, Lamont⁶³, 2010; Christopher et al.¹⁶, 2013). Os microrganismos aderidos se desenvolvem e criam microcolônias que sintetizam a matriz (que pode conter exopolissacarídeos e outros componentes),

que passa a atuar como substrato para a aderência de novos microrganismos denominados colonizadores secundários (Kuboniwa, Lamont⁶³, 2000; Nobbs et al.⁸⁴, 2009). Colonizadores secundários podem se aderir facilmente aos primários, e/ou facilitar a coagregação de outros microrganismos para se aderirem aos colonizadores primários e gerar um grande acúmulo estruturado de microrganismos (Fejerskov²⁸, 2004; Nobbs et al.⁸⁴, 2009).

Por décadas, a espécie *S. mutans* foi considerada como o principal microrganismo etiológico da cárie dentária em humanos (Loesche⁷⁰, 1986). *S. mutans* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos; e tem sido estudado por meio de diversas técnicas bioquímicas, sorológicas e genéticas. Porém, *S. mutans* não é o único microrganismo acidogênico na microbiota oral. Existem outros microrganismos que possuem acidogenicidade igual ou maior (por exemplo, *Streptococcus vestibulares*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium dentium*, *Candida spp* e *Scardovia spp*) (Takahashi, Nyvad¹¹³, 2011).

Assim, para o desenvolvimento de cárie, diferentes microrganismos interagem: *Streptococcus mutans*, estreptococos não mutans (por exemplo, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus salivarius*) e outras espécies bacterianas (por exemplo: *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Bifidobacterium dentium*, *Scardovia spp.*, *Veillonella spp.*, *Atopobium parvulum*, *Dialister invisus*) (Becker et al.⁵, 2002; Torlakovic et al.¹¹⁸, 2012). Ainda, o fungo *Candida albicans* tem sido associado com a forma mais agressiva dessa doença (de Carvalho et al.²², 2005; Falsetta et al.²⁷, 2014). Algumas espécies de *Streptococcus*, incluindo a espécie *Streptococcus gordonii*, são capazes de competir com *S. mutans*, produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e bacteriocinas, para conseguir um espaço para aderência à superfície de hidroxiapatita coberta com película salivar (SHA) (Kreth et al.^{61, 62}, 2008, 2009).

Formação do biofilme, capacidade de aderência, acidogenicidade, tolerância ao ácido ou aciduricidade e produção de bacteriocinas (mutacinas), são os principais fatores de virulência associados a cariogenicidade de *S. mutans*. (Gronroos et al.³⁵, 1998; Banas⁴, 2004; Paes et al.⁸⁶, 2006; Lemos, Burne⁶⁶, 2008; Takahashi¹¹⁴, 2015). A capacidade de produção de mutacina pode favorecer a instalação e colonização de *S. mutans* no biofilme dentário aumentando o risco de cárie (Gronroos et al.³⁵, 1998).

Porém, nem todas as cepas dessa espécie são capazes de produzir mutacinas ou biofilme com matriz rica em exopolissacarídeos (EPS) (Palmer et al.⁸⁷, 2013).

A aderência de *S. mutans* à superfície dentária acontece principalmente na presença de carboidratos usados para formação da MEC. Embora esta espécie possua um mecanismo de aderência independente de sacarose via adesinas (*i.e.*, SpaP, Wap, Agl/II) que se ligam a receptores na película, a via dependente de sacarose mediada por ligação de glicanos está diretamente relacionada com a cariogenicidade do biofilme, como revisado por Mattos-Graner et al.⁷⁶, (2014) e por Hajishengallis et al.³⁹ (2015). O mecanismo de aderência dependente de sacarose é guiado pelas exoenzimas Gtfs, que sintetizam EPS (Loesche⁷⁰, 1986; Yamashita et al.¹²⁴, 1993; Bowen, Koo⁸, 2011). Ainda, o aumento de carboidratos fermentáveis na cavidade oral poderia aumentar a produção de ácido no biofilme (como revisado por Takahashi¹¹⁴, 2015).

No presente estudo, trabalhou-se com três espécies para formar um biofilme misto, *Streptococcus mutans* UA159 é o organismo cariogênico, *Streptococcus gordonii* DL-1 é representante dos colonizadores iniciais estreptococos não mutans, e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 é o representante dos colonizadores iniciais não estreptococos. O resumo das características dos três organismos no modelo de biofilme utilizado está representado no Quadro 1. O pH baixo induz a síntese de EPS enquanto microrganismos como *S. mutans* prosperam (Li e Burne⁶⁷, 2001; Smith e Spatofora¹⁰⁶, 2012, Klein et al.^{56, 57}, 2013, 2015).

S. gordonii expressa em sua superfície proteína ligante de α -amilase (Bowen e Koo⁸ 2011; Tanzer et al.¹¹⁶, 2012; Zhang, Senpuku¹²⁶, 2013). A enzima α -amilase atua como um receptor para o aumento da aderência bacteriana à película na superfície do dente ou hidroxiapatita, ajudando na formação de biofilmes na presença de amido (Scannapieco et al.¹⁰¹, 1995; Rogers et al.⁹⁷, 2001). A enzima α -amilase está presente na saliva, faz parte da película adquirida e digere amido da dieta em hidrolisados que são utilizados como aceptores de elétron durante a síntese de glicanos pelas Gtfs de *S. mutans* (como revisado por Bowen, Koo⁸, 2011).

A. naeslundii é uma bactéria anaeróbia facultativa que coloniza a língua e outras superfícies mucosas, e superfícies dos dentes. Estudos mostram que *A. naeslundii* poderiam estar envolvidos na formação de biofilme, cárie de cimento e

destruição periodontal (Socransky et al.¹⁰⁷, 1970; Kneist et al.⁵⁸, 2012). *A. naeslundii* é produtor de ácidos na presença de açúcares (Kneist et al.⁵⁸, 2012). Durante a formação do biofilme, *A. naeslundii* produz ácido lático a partir de carboidratos da dieta e prolifera (Yaling et al.¹²⁵, 2006). De tal modo, assegura um espaço no biofilme até que as condições favoreçam o crescimento aumentado de *S. mutans* (Burt et al.¹¹, 1985; Takahashi, Yamada¹¹⁷, 1999). Porém, o potencial patogênico de *A. naeslundii* em relação ao metabolismo de sacarose é pouco claro. *A. naeslundii* na presença de sacarose apresenta potencial patogênico em doenças orais relacionadas com biofilmes e fornece substratos acidogênicos para os demais microrganismos presentes em um biofilme misto (Miller⁸⁰, 1974).

Quadro 1 - Características das cepas utilizada no biofilme misto

	<i>S. mutans</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>A. naeslundii</i>
Características relacionadas à formação de biofilme	• Adesinas ancoradas na parede celular ou associadas à superfície celular – utilizadas para aderência à película e outros organismos. (SpaP/P1/PAC/Sr/AgB), • GtfBCD: produção de glucanos (exopolissacarídeos na MEC), • GbpABCD: proteínas ligantes de glucanos, • Ftf: produção de frutano (exopolissacarídeos da MEC), • eDNA na MEC, • ALT na MEC.	• Adesinas ancoradas na parede celular ou associadas à superfície celular – utilizadas para aderência à película e outros organismos (SspA, SspB, GspB, Has, CshA), • GtfG: produção de glucano (exopolissacarídeos na MEC), • Gpps: ainda desconhecidos, • eDNA na MEC, • ALT na MEC.	• Ftf: produção de frutano (exopolissacarídeos na MEC), • eDNA na MEC (desconhecidos), • ALT na MEC (desconhecidos).
Acidogenicidade e aciduricidade	Acidogênica e acidúrica.	Acidogênica e acidúrica.	Acidogênico e acidúrica.
Ação enzimática	Catalase negativo e é suceptível ao H ₂ O ₂ . Produção de mutacina.	Catalase negativo, apresenta tolerância ao H ₂ O ₂ .	Catalase positivo.
Caraterísticas de crescimento	Anaeróbio facultativo.	Anaeróbio facultativo.	Anaeróbio facultativo.

Fonte: Jakubovics et al.⁴⁸, 2013.

2.3 A matriz extracelular de biofilme

A matriz de biofilmes tem os exopolissacarídeos como componentes indispensáveis para a sua construção e estruturação 3D (Branda et al.¹², 2005; Flemming, Wingender³¹, 2010). A MEC protege seus microrganismos contra dessecação, oxidação, alguns antibióticos e cátions metálicos, radiação ultravioleta e defesas imunológicas (Flemming, Wingender³¹, 2010). EPS, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e lipopolissacarídeos são identificados dentro da matriz de biofilmes (Karatan, Watnick⁴⁹, 2009; Schooling et al.¹⁰³, 2009; Mann et al.⁷², 2009). A atividade metabólica de microrganismos dentro da MEC, limitam a difusão na matriz (e.g., metabólitos microbianos), e no caso de biofilmes formados sobre os dentes, esse processo ocasiona a acidificação do meio e o ácido induz a dissolução do esmalte (Xiao et al.¹²³, 2012).

Os **exopolissacarídeos** são essenciais na construção da matriz extracelular (Bowen, Koo⁸, 2011), embora eDNA e ALT extracelulares sejam também encontrados em altas quantidades nos biofilmes cariogênicos (Jacques et al.⁴⁶, 1979; Rölla et al.^{98, 99}, 1980, 1983; Ciardi et al.¹⁸, 1981; Hogg et al.⁴³, 1997; Paes Leme et al.⁸⁶, 2006).

EPS fornecem estabilidade mecânica para o biofilme, mediando a aderência à superfície dentária (Bowen, Koo⁸, 2011; Hwang et al.⁴⁵, 2014). A matriz rica em EPS mantém as células do biofilme o mais próximo possível, permitindo a interação e comunicação células – células (Flemming, Wingender³¹, 2010). Os exopolissacarídeos sintetizados *in situ* permitem a aderência e acúmulo dos microrganismos nos dentes (Bowen et al.⁷, 1991; Vacca-Smith, Bowen¹²⁰, 1998; Banas, Vickerman³, 2003 Hannig et al.⁴⁰, 2008;).

Os EPS são sintetizados pelas enzimas glicosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftfs) na presença da sacarose (Vacca-Smith et al.¹¹⁹, 1996; Van Hijum et al.¹²¹, 2006; Bowen, Koo⁸, 2011). Ainda, a presença de amido hidrolisado intervém na produção e estrutura de glicanos por servirem com aceptores de elétrons durante a síntese desses polímeros (Vacca-Smith et al.¹¹⁹, 1996; Duarte et al.²⁴, 2008; Klein et al.⁵², 2009). Assim, a composição da dieta é essencial no papel dos EPS na patogenicidade da cárie (Parisotto et al.^{88, 89}, 2010; 2015).

As Gtfs são capazes de produzir glicanos insolúveis e solúveis em água (Klein et al.⁵⁶, 2013). *S. mutans* produz pelo menos três Gtfs distintas (codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*), as quais utilizam sacarose e amido para sintetizar EPS (Bowen, Koo⁸, 2011). A GtfC é encontrada principalmente na película em uma forma enzimaticamente ativa (Vacca-Smith, Bowen¹²⁰, 1998), e sintetiza ambos glicanos solúveis e insolúveis (Bowen, Koo⁸, 2011). A GtfB liga-se às superfícies microbianas e pode influenciar o acúmulo de vários microrganismos orais (por exemplo, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*), pois converte esses organismos que não possuem Gtfs em produtores glicano insolúveis (Vacca-Smith, Bowen¹²⁰, 1998; Gregoire et al.³⁴, 2011; Bowen, Koo⁸, 2011). A GtfD pode sintetizar glicanos solúveis presentes na MEC (Bowen, Koo⁸, 2011). Os EPS formados na superfície microbiana melhoram as interações entre os microrganismos e aumentam a coesão dos mesmos (Cross et al.²⁰, 2007).

DNA extracelular (eDNA) e ácido lipoteicoico (ALT) são encontrados em quantidades elevadas na matriz de biofilmes cariogênicos na presença de sacarose e amido (Ciardi et al.^{17, 18}, 1977, 1981; Jacques et al.⁴⁶, 1979; Rolla et al.⁹⁸, 1980; Hardy et al.⁴¹, 1981; Perry et al.⁹¹, 2009; Klein et al.⁵³, 2010). eDNA geralmente é um bioproduto da autólise (Steinberger, Holden¹⁰⁹, 2005; Allesen-Holm et al.², 2006; Perry et al.⁹¹, 2009), e pode também ser secretado via microvesículas ou vesículas de membrana (Liao et al.⁶⁸, 2014).

eDNA está envolvido na construção de diversos biofilmes formados por microrganismos orais. O eDNA participa na agregação bacteriana e aderência à superfície devido às interações ácido-base, assim, aumenta a aderência de *S. mutans* (Das et al.²¹, 2010; Klein et al.⁵³, 2010). eDNA parece ser incorporado na matriz porque a adição da enzima DNase interrompeu a integridade estrutural dos biofilmes, e diminuiu o peso seco desses biofilmes em 30% (Klein et al.⁵³, 2010; Liao et al.⁶⁸, 2014.), o que suporta a teoria de que eDNA teria um papel importante na estrutura do biofilme.

A presença de sacarose e de amido aumenta a liberação de eDNA na MEC em quantidades elevadas devido à indução da expressão dos genes *lytTS* e *ccpA* durante a formação de biofilme por *S. mutans* (Klein et al.⁵³, 2010). O sistema de dois componentes *lytTS* é necessário para ativar a expressão dos genes *lrgAB* que fazem

parte do arsenal de *S. mutans* que controla autólise e formação de biofilme (Ahn et al.¹, 2010). A expressão de *lytTS* e *IrgAB* é regulada através da disponibilidade de carboidratos via proteína CcpA (*Catabolite control protein A*) (Ahn et al.¹, 2010). A expressão do gene *gtfB* (que sintetiza EPS insolúveis) também foi induzida nesses biofilmes formados na presença de sacarose e amido (Klein et al.^{52, 53}, 2009, 2010). Portanto, eDNA interagindo com GtfB pode ter funções importantes na produção de EPS, colonização por *S. mutans* e construção de MEC (Klein et al.⁵³, 2010; Liao et al.⁶⁸, 2014). Em adição, durante o desenvolvimento de biofilme cariogênico apenas com a espécie *S. mutans*, eDNA é detectado conectando glicanos (Liao et al.⁶⁸, 2014). Ainda, deficiência na secreção de proteínas e de componentes para inserção de proteínas na membrana (*i.e.*, Ffh, YidC1 e YidC2) pode reduzir a quantidade de eDNA na matriz (Liao et al.⁶⁸, 2014). Portanto, alteração nesses processos podem alterar a composição da MEC e influenciar o potencial de virulência do biofilme. Porém, não se conhece como eDNA afeta o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos mistos.

Assim, o gene *gtfB* é essencial para a formação de biofilmes dependente de sacarose e fator de virulência comprovado associado à patogenia da cárie dentária (Yamashita et al.¹²⁴, 1993). Quando o eDNA interage com a enzima GtfB, o mesmo poderia desenvolver um papel importante na produção de EPS, colonização da espécie *S. mutans* e na montagem e construção da matriz do biofilme altamente coesiva (Klein et al.⁵³, 2010; Liao et al.⁶⁸, 2014; Klein et al.⁵⁷, 2015).

ALT pode também ser importante na construção da MEC e ajudar na formação do biofilme (Ciardi et al.¹⁷, 1977; Kuramitsu et al.⁶⁴, 1980; Rolla et al.⁹⁸, 1980). Na presença de sacarose e amido da dieta, o ALT aumenta a aderência de microrganismos à superfície dentária (Kuramitsu et al.⁶⁴, 1980; Rolla et al.⁹⁸, 1980). ALT são polímeros anfifílicos de poli-ol-fosfatos, ancorados na membrana celular por um glicolípido e podem ser liberados para o ambiente extracelular (Ellwood, Tempest²⁶, 1972; Brock, Reiter¹³, 1976; Neuhaus, Baddiley⁸², 2003), especialmente durante a remodelagem da parede celular. O mecanismo de síntese de ALT foi descrito para algumas espécies, mas não para *S. mutans* (Reichmann, Gründling⁹⁵, 2011; Denapate et al.²³, 2012). Análise de homologia utilizando BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) mostrou que o gene *SMU.775* de *S. mutans* (uma proteína hipotética) é um homólogo do gene *ItaS* que codifica a

enzima sintetase de ALT em *Staphylococcus aureus*. Já o operon *dltABCD* é necessário para a adição de resíduos de D-alanina (Neuhaus, Baddiley⁸², 2003) durante a formação de ALT; esses resíduos afetam os processos de aderência e de formação de biofilme (Spatafora et al.¹⁰⁸, 1999; Gross et al.³⁶, 2001). Ainda, as proteínas de *S. mutans* codificadas pelos genes *dltA*, *dltD* e *SMU.775* são abundantes enquanto a matriz está sendo ativamente construída durante as fases iniciais de formação de biofilme cariogênico (Klein et al.⁵⁵, 2012).

eDNA e ALT poderiam ajudar na construção da MEC através do aumento da síntese de glicanos (Kuramitsu et al.⁶⁴, 1980; Ciardi et al.¹⁸, 1981; Chiu, Baker¹⁵, 1994) e promoção da aderência bacteriana às superfícies (Ciardi et al.^{17, 18}, 1981, 1977; Gross et al.³⁶, 2001; Götz³³, 2002; Das et al.²¹, 2010). Essas biomoléculas também conferem carga negativa à MEC, o que resulta na alteração das propriedades de difusão da MEC (Melvaer et al.^{78, 79}, 1972, 1974; Melsen et al.⁷⁷, 1979; Pratten et al.⁹², 1998; Hope et al.⁴⁴, 2004). Portanto, a presente hipótese alternativa é a de que eDNA e ALT atuando em conjunto com exopolissacarídeos têm impacto na construção e nas propriedades estruturais e funcionais da MEC durante a formação do biofilme cariogênico.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi: **Elucidar a função de eDNA e ALT nas propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular de biofilmes cariogênicos.** Foram utilizadas metodologias para avaliar se eDNA e ALT estão envolvidos na construção contínua da MEC, usando biofilmes monoespécie de *S. mutans* e misto (contendo *S. mutans*, *S. gordonii* e *A. naeslundii*) na presença de sacarose e amido. *S. mutans* UA159 (cepa parental) e cepas mutantes *knockout* para os genes *lytTS* e operon *dltABCD* foram estudadas para verificar como a modulação de componentes da MEC através da ausência de genes específicos influencia a formação e desenvolvimento de biofilmes cariogênicos. A cepa mutantes *knockout* para o gene *gtfB* foi utilizada como controle de um biofilme potencialmente menos patogênico.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para elucidar a **função de eDNA e de ALT nas propriedades estruturais e funcionais (biológicas) da MEC** foram desenvolvidas duas fases principais: A) Formação inicial da matriz, a qual é crítica para a aderência e acúmulo microbiano na superfície de hidroxiapatita (HA); e B) Construção 3D da matriz e do biofilme.

4.1 Formação de biofilmes para análise da matriz extracelular e avaliação da dinâmica populacional

Com o objetivo de gerar biofilmes mistos contendo *S. mutans* UA159 (cepa parental e mutantes *knockout* - Quadro 2), *S. gordonii* DL-1 e *A. naeslundii* ATCC 12104, foram realizados experimentos segundo os grupos experimentais descritos no Quadro 3, que foram avaliados nas idades 67 h e 115 h de formação de biofilme. Ainda, formou-se biofilmes monoespécie contendo *S. mutans* UA159 (cepa parental e mutantes *knockout*), conforme grupos experimentais descritos no Quadro 3.

Quadro 2 - Cepas de *S. mutans* utilizadas no estudo

Cepas		Gene alvo			Potencial de modulação de componentes da MEC	Referências
		Nome	Locus Tag*	Oralgen ID**		
Parental UA159		---	---	---	---	---
Cepas mutantes derivadas da cepa parental UA159	$\Delta gtfB::kan$	<i>gtfB</i>	SMu.1004	---	EPS insolúvel	Dr. Robert A. Burne
	$\Delta SMu.525::erm$	<i>lytT</i>	SMu.576	SMu.525	eDNA	Chatfield et al ¹⁴ , 2005
	$\Delta SMu.526::erm$	<i>lytS</i>	SMu.577	SMu.526		
	$\Delta SMu.1538::erm$	<i>dltA</i>	SMu.1691	SMu.1538	ALT	Quivey et al ⁹⁴ , (2015)
	$\Delta SMu.1541::erm$	<i>dltD</i>	SMu.1688	SMu.1541		

* nomenclatura utilizada pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information).

** nomenclatura utilizada pelo Los Alamos Laboratories. *Erm*: 5 µg/mL de eritromicina em placas de BHI ágar. *Kan*: 1 mg/mL de kanamicina em placas de BHI ágar.

Fonte: Elaboração própria

Para os biofilmes formados com cepas mutantes *knockout* utilizou-se:

- Genes *lytTS* ($\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$) que estão associados ao eDNA e que poderiam levar à formação de uma MEC coesiva com elevadas quantidades de exopolissacarídeos e de eDNA;

- Genes do operon *dltABCD* (Δ SMu.1538 e Δ SMu.1541) associados à síntese de proteínas do metabolismo de ALT, e que poderiam influenciar na composição de componentes do biofilme, especialmente ALT na MEC;
- Gene *gtfB*, que codifica a enzima GtfB que se liga efetivamente em ambas superfícies da película formada sobre hidroxiapatita e de bactérias e utiliza sacarose como substrato para síntese de exopolissacarídeos insolúveis em água (mas solúveis em álcali) e também hidrolisados de amido como aceptores durante a síntese desses EPS (Bowen, Koo⁸, 2011).

Quadro 3 - Grupos experimentais

Grupo	Biofilmes mistos	Biofilmes monoespécie
1	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa parental) + <i>A. naeslundii</i> ATCC 12104 + <i>S. gordonii</i> DL-1	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa parental)
2	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.525) + <i>A. naeslundii</i> + <i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.525)
3	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.526) + <i>A. naeslundii</i> + <i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.526)
4	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.1538) + <i>A. naeslundii</i> + <i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.1538)
5	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.1541) + <i>A. naeslundii</i> + <i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ SMu.1541)
6	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ gtfB) + <i>A. naeslundii</i> + <i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i> UA159 (cepa Δ gtfB)

*Foram desenvolvidos seis grupos experimentais para biofilmes monoespécie e mistos. Os biofilmes mistos com idade 67 h foram processados em cinco ocasiões e com idade 115 h em três ocasiões; já para biofilmes monoespécie foram feitos em três ocasiões nas duas idades de formação. **Todos os biofilmes foram realizados em duplicata.

Fonte: Elaboração própria.

Os grupos controles foram *S. mutans* UA159 (cepa parental) e a cepa mutante Δ gtfB que apresenta formação de biofilme in vitro atenuada (Koo et al.⁵⁹, 2010; Xiao et al.¹²³, 2012), e patogenicidade reduzida in vivo (Tanzer et al.¹¹⁵, 1985; Yamashita et al.¹²⁴, 1993) – cepa fornecida pelo Prof. Robert Burne, *University of Florida*. As cepas mutantes *knockout* dos genes *lytTS* e operon *dltABCD* foram doadas pelo Prof. Dr. Robert G. Quivey Jr, e a construção das mesmas está descrita detalhadamente na referência Quivey et al.⁹⁴, (2015). As cepas *S. gordonii* DL-1 e *A. naeslundii* ATCC 12104 são acidogênicas e produtoras de glicanos solúveis em água e frutanos, respectivamente (Bergeron et al.⁶, 2000; Haisman, Jenkinson³⁸, 1991). Assim temos um modelo de biofilme misto, formado por: espécie de microrganismo cariogênico (*S.*

mutans), um representante de estreptococos orais não mutans (*S. gordonii*), e um microrganismo não estreptococos (*A. naeslundii*). Ainda, as características conhecidas de cada organismo estão detalhadas na revisão de literatura (Quadro 1). Para biofilmes monoespécies de *S. mutans*, foram utilizadas as seis cepas desta espécie individualmente (parental e cinco mutantes).

4.1.1 Procedimentos para preparo dos biofilmes

Estoques de cada cepa estão armazenados em freezer -80°C. As cepas foram reativadas utilizando-se o método de semeadura por esgotamento em placas de meios de cultura ágar sangue (5% sangue de cordeiro -Laborclin) para a cepa parental UA159, cepas *S. gordonii*, *A. naeslundii* e Δ gtfB; e ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) com eritromicina (5 µg/ml, SIGMA) para as cepas *knockout* para os genes *lytTS* e operon *dltABCD*, pois as mesmas possuem o gene de resistência à eritromicina utilizado na construção dessas mutantes. As placas com os microrganismos foram incubadas por 48 h (37°C e 5% de CO₂). Após este período, as placas com cada cepa foram armazenadas em geladeira (4°C) até seu uso, e cada placa foi utilizada até completar 1 mês de reativação, exceto para *A. naeslundii* que foi de 15 dias.

Dois dias antes do experimento, realizou-se o pré-inóculo da cepa *A. naeslundii* através da transferência de 5-10 colônias individuais para tubos tipo Falcon contendo 10 mL de meio líquido TY (*Tryptone* + *Yeast Extract*, Difco) com 1% de glicose (Synth). Dois tubos foram incubados durante 24 h (37°C e 5% de CO₂).

Um dia antes do experimento, realizou-se o pré-inóculo para *S. gordonii* e as cepas mutantes e parental de *S. mutans* similar ao realizado com o pré-inóculo da *A. naeslundii*. Os tubos foram incubados durante 18 h (cultura *overnight*; 37°C e 5% de CO₂).

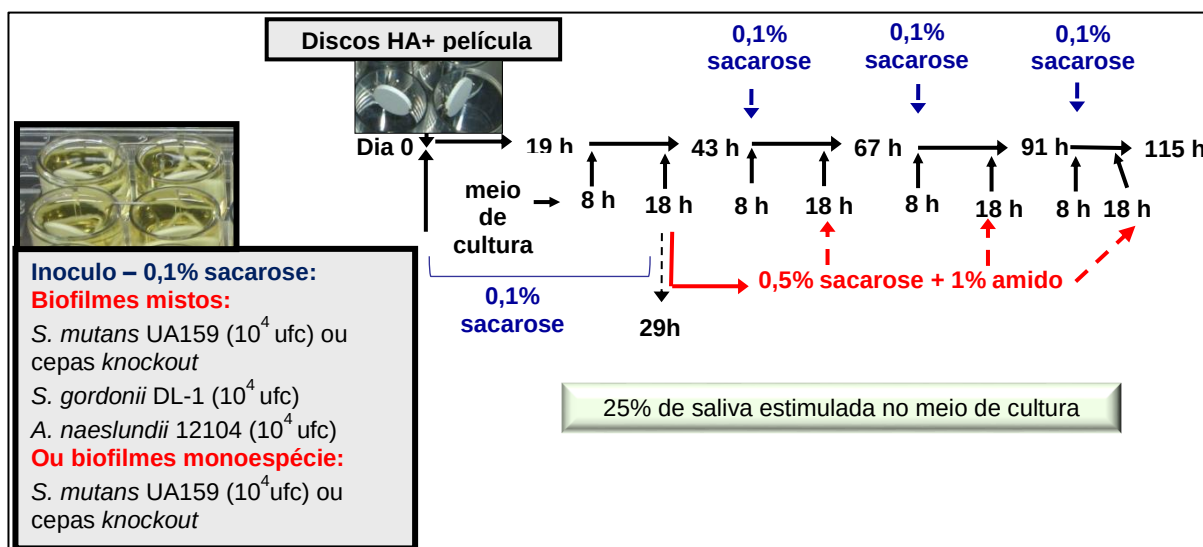
Após 24 h pré-inóculo da cepa *A. naeslundii*, foi realizado três opções de inóculo: a) 300 µL de pré-inóculo em tubo tipo Falcon contendo 9,7 mL de meio líquido TY com 1% de glicose, b) 100µL de pré-inóculo para 9,9 mL de meio, c) 50 µl de pré-inóculo para 9,95 mL do mesmo meio. Os tubos foram incubados até a obtenção da D.O._{540nm} ± 1.5 (~ 21 h / 37°C e 5% de CO₂). Foi escolhido um dos tubos de inóculo

contendo a D.O._{540nm} desejada. Após a obtenção do inóculo, o mesmo teve uma alíquota separada para verificação de possível contaminação através de microscópio óptico.

Após 18 h do pré-inóculo de cepas mutantes e parental de *S. mutans* e *S. gordonii*, o inóculo foi realizado através da adição de 500 µL de cada pré-inóculo em tubos tipo Falcon contendo 9,5 mL de meio líquido TY com 1% de glicose. Os tubos foram incubados até a obtenção da D.O._{540nm} ± 1.0 (~ 4 h / 37°C e 5% de CO₂). Verificou-se possível contaminação via microscopia.

Para a formação dos biofilmes, utilizou-se a superfície de discos de hidroxiapatita - HA (12,7 mm de diâmetro, 1 mm de espessura, Clarkson Chromatography Products Inc., South Williamsport, PA). Esses discos foram posicionados verticalmente em placas 24 poços com auxílio de aparato confeccionado com fio ortodôntico (para evitar efeito de depósitos microbianos devido à gravidade), cobertos por película salivar (Figura 2).

Figura 2 - Desenho experimental do modelo de biofilme utilizado



Formação de biofilmes mistos com três espécies: *Streptococcus mutans* (cepa parental ou mutantes), *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus gordonii*, para o biofilme monoespécies foram utilizadas apenas as cepas de *S. mutans* (cepa parental ou mutantes). HA: hidroxiapatita.

Fonte: Elaboração própria.

Para a formação da película salivar realizou-se o seguinte procedimento: A saliva foi estimulada pela mastigação de um pedaço de parafilme pelo voluntário (de

acordo com o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição Sede, CAAE: 31717914.3.0000.5416; Número do Parecer: 748.142) (Ver ANEXO A). Coletado o volume desejado, misturou-se a saliva com tampão de adsorção (Tampão AB – 0,05 M KCl; 0,02 M KPO₄; 0,02 M CaCl₂; 0,02 M MgCl₂ – pH 6,5) em uma proporção de 1:1 (v/v) e adicionou-se 0,1 M PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila, SIGMA) à uma relação de 1:1000 (para concentração final de 0,1 mM PMSF). Em seguida, o conteúdo foi centrifugado (15 min, 5000 g, 4°C – Centrífuga 5810R, Eppendorf). O sobrenadante foi recolhido (saliva clarificada) e filtrado usando filtro PES (polietersulfona) de poros de 0,22 µm. A saliva foi mantida no gelo até a sua utilização. Um volume de 2,8 mL de saliva esterilizada foi transferido para cada poço de placa de 24 poços. Em seguida, cada aparato com os discos de hidroxiapatita (pré-hidratados em água MiliQ esterilizada) foi transferido para a placa (com auxílio de pinça clínica), sendo um total de 6 aparatos por experimento com os discos, correspondente a 1 aparato por cepa utilizada (cepa parental e mutantes de *S. mutans*). A placa com os discos e saliva foi incubada à 37°C, sob agitação/75 rpm (Quimis G816M20) durante 1 h para formação da película (SHA). Os aparatos contendo discos SHA foram então enxaguados duas vezes em tampão AB e em uma placa nova foram transferidos (com auxílio de pinça esterilizada) para meio de cultura contendo cada de *S. mutans* individualmente, como descrito a seguir.

Após atingir a D.O. desejada, o inóculo bacteriano de cada cepa para a formação de biofilme misto foi preparado utilizando-se 10 mL de meio líquido TY com 0,1% de sacarose (Synth) contendo 25% de saliva. A saliva foi preparada como descrito para a película. O meio de cultura foi preparado concentrado 1,25X e diluído 1:4 com saliva esterilizada imediatamente antes do uso, e após foi adicionada a sacarose. Em seguida, foram adicionados: 10 µL de cada inóculo de *S. mutans* em tubos individuais com o meio de cultura (para ter 10⁴ UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mL); 200 µL de *A. naeslundii* (para ter 10⁴ UFC/mL); e 25 µL de *S. gordonii* (para ter 10⁴ UFC/mL) em tubos marcados com as diferentes cepas de *S. mutans*. Os aparelhos/discos SHA foram colocados em seus respectivos poços contendo o meio inoculado. Então, foram incubados por 19 h (37°C e 5% de CO₂). Ainda, para o controle de qualidade de cada experimento, uma alíquota de cada inóculo foi plaqueada para verificar se a quantidade de cada cepa estava correta

(UFC/ml). Para os biofilmes monoespécies, utilizou-se apenas o inóculo das cepas de *S. mutans* parental e mutantes.

Todas as soluções utilizadas foram devidamente esterilizadas e o início desta incubação foi considerado o dia 0 (idade do biofilme 0 h). Foram realizadas trocas do meio cultura (com auxílio de pinça para movimentar os aparatos do meio “velho” para o meio fresco “novo”) duas vezes ao dia (Koo et al.⁵⁹, 2010), utilizando um modelo de “miséria e fartura” de nutrientes como descrito a seguir:

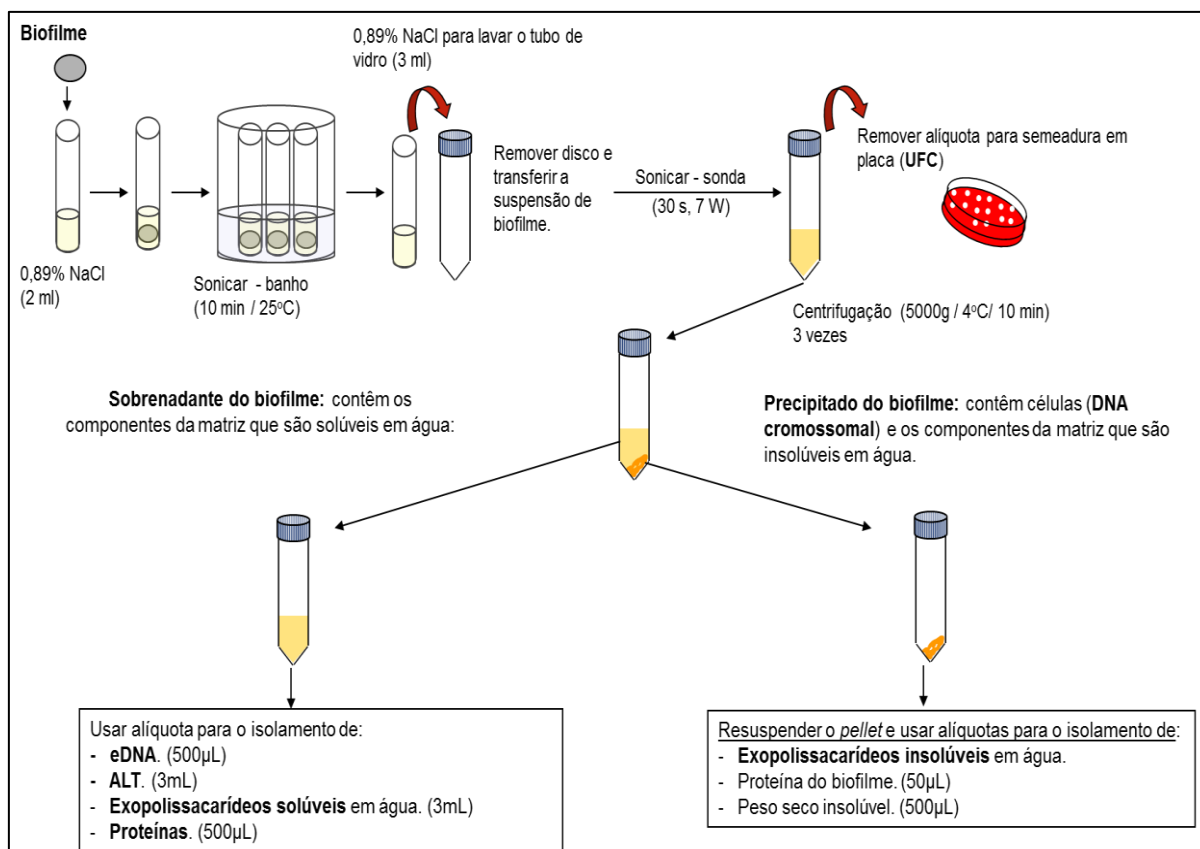
- 19 h de incubação (8:00 h do dia 1): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,1% de sacarose + saliva;
- 29 h de incubação (18:00 h do dia 1): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,5% de sacarose + 1% de amido (Sigma) + saliva;
- 43 h de incubação (8:00 h do dia 2): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,1% de sacarose + saliva;
- 53 h de incubação (18:00 h do dia 2): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,5% de sacarose + 1% de amido (Sigma) + saliva;
- 67 h de incubação (8:00 h do dia 3): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,1% de sacarose + saliva;
- 77 h de incubação (18:00 h do dia 3): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,5% de sacarose + 1% de amido (Sigma) + saliva;
- 91 h de incubação (8:00 h do dia 4): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,1% de sacarose + saliva;
- 101 h de incubação (18:00 h do dia 4): os aparelhos/discos de HA foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,5% de sacarose + 1% de amido (SIGMA) + saliva.

Os biofilmes crescidos até as diferentes idades avaliadas foram incubados com o mesmo ambiente inicial de 0 h (37°C e 5% de CO₂). Os meios de culturas velhos foram utilizados para determinação do pH usando pHmetro (Qualxtron Qx 1500 plus), incluindo as idades nas quais os biofilmes foram processados: 67 h e 115 h para análises dos componentes da MEC, e 29, 43, 53, 67, 77, 91, 101, 115 h para avaliação da dinâmica populacional.

4.2 Processamento dos biofilmes para análise populacional e dos componentes da matriz extracelular

Os biofilmes foram processados como descrito a seguir e ilustrado na Figura 3:

Figura 3 - Esquema do processamento de biofilmes para análises microbiológica e bioquímicas



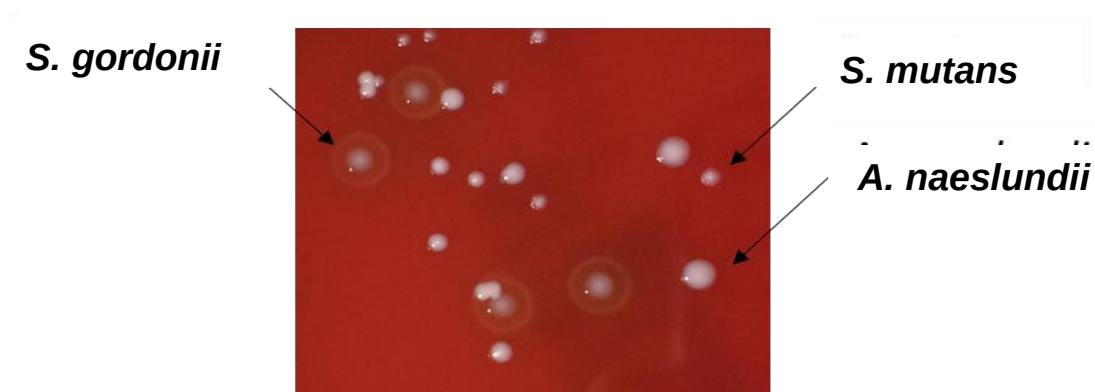
Fonte: Elaboração própria

Foi adicionado NaCl a 0,89%, estéril, em novos poços em placas de 24 poços para enxague dos discos (três vezes); após os discos foram removidos com auxílio de pinça clínica e acondicionados em tubos de vidros separadamente (um disco em cada

tubo de vidro); adicionou-se 2 mL de NaCl 0,89%. Os tubos com os discos foram transferidos para um béquer contendo água MiliQ e sonificados por 10 min (em banho ultrassônico), para remoção dos biofilmes dos discos. Os discos foram raspados com ajuda de espátulas de aço inoxidável esterilizadas para remover biofilme residual; a suspensão do biofilme foi transferida para novos tubos tipo Falcon de 15 mL; os tubos de vidro foram lavados com 3 mL de NaCl 0,89% e adicionou-se o líquido aos tubos tipo Falcon (correspondentes a cada disco individualmente). Finalmente o conteúdo foi homogeneizado com sonda por 30 segundos à 7 watts (Sonicador modelo Q125, QSonica).

Portanto, o volume final da suspensão do biofilme é de 5 mL em NaCl 0,89%. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi transferida para tubo contendo 900 µL de NaCl 0,89%, para realizar diluição seriada. As diluições 10^{-4} e 10^{-5} foram plaqueadas em ágar sangue (duplicata) e as placas foram incubadas por 48 h (37°C e 5% de CO₂). Após este período, as colônias foram contadas visualmente/manualmente e utilizadas para o cálculo de UFC por biofilme (Figura 4). Biofilmes foram processados para quantificação de UFC nas idades de 29, 43, 53, 67, 77, 91, 101 e 115h, os dados de contagem foram analisados estatisticamente.

Figura 4 - Imagem representativa de morfologia de colônias de cada espécie recuperadas de biofilmes mistos

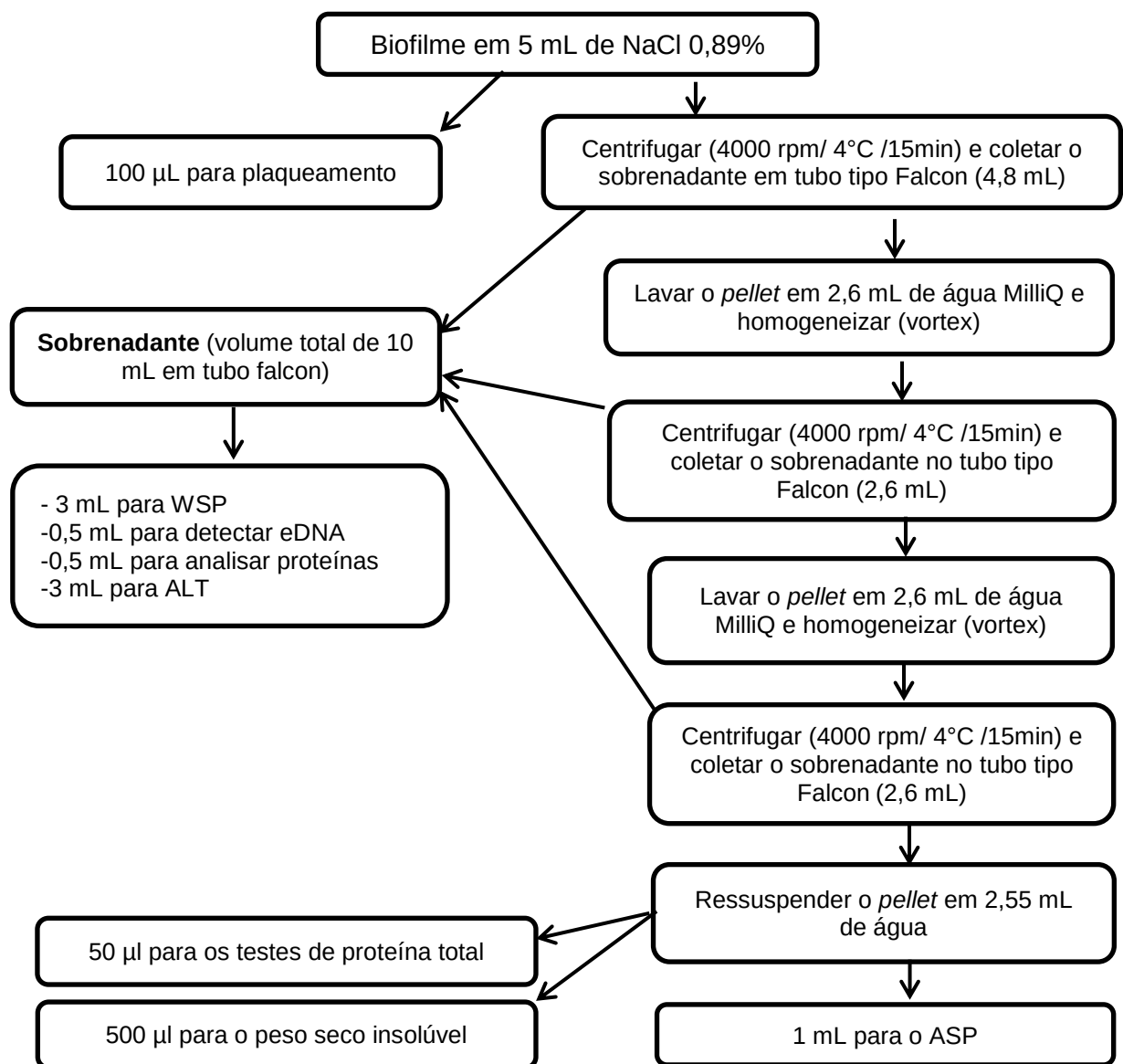


Biofilmes mistos, em placa de ágar sangue após incubação (48h/ 5% CO₂), para quantificar as espécies em diferentes idades. As espécies são facilmente diferenciáveis: *S. mutans* apresenta colônia branca rugosa, especialmente na sua borda; *A. naeslundii* apresenta colônia branca com uma borda lisa; e finalmente *S. gordonii* apresenta colônia amarelada com um anel bem definido em torno da mesma.

Fonte: Elaboração Própria

Outra alíquota de 100 µL foi armazenada em *freezer* -20°C para futuros experimentos. Os 4,8 mL restantes de suspensão de biofilme de cada disco foram utilizados para análises bioquímicas. Assim, as suspensões foram centrifugadas (4000 rpm/ 4°C /15min, centrífuga 5810R, Eppendorf) e cada sobrenadante foi coletado em tubo tipo Falcon (4,8 mL). O *pellet* de cada biofilme foi lavado com 2,6 mL de água Milli-Q e homogeneizado (vórtex). Esses passos foram repetidos 2 vezes (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma para processamento dos biofilmes para análises da população microbiana e bioquímicas



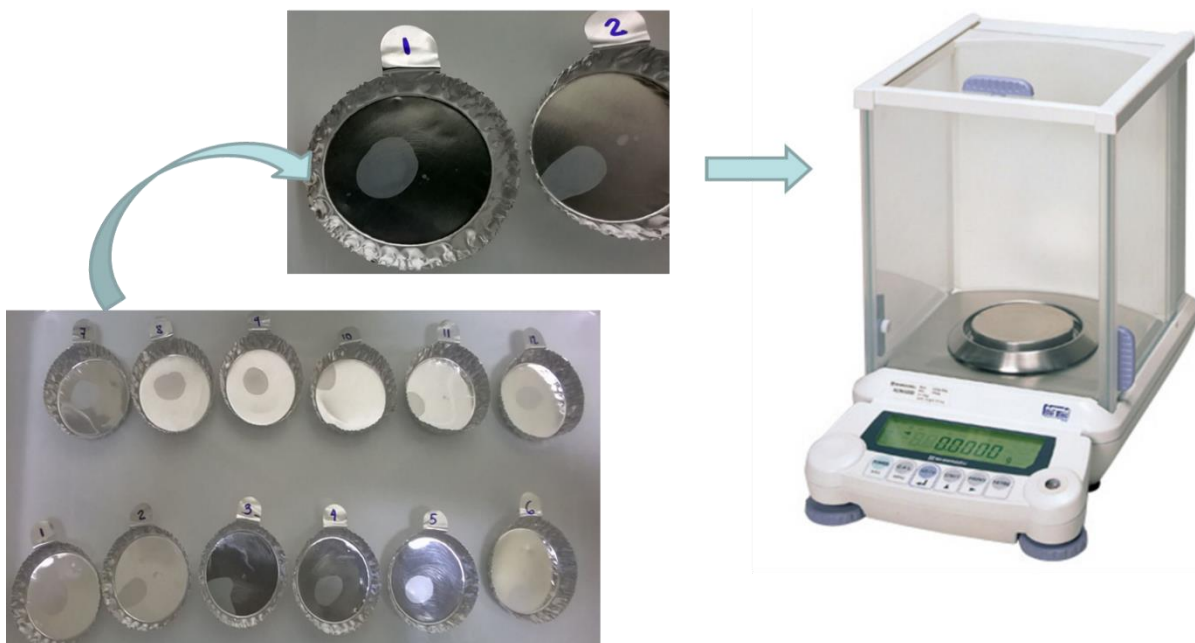
Fonte: Elaboração própria

De sobrenadante, foram coletados 10 mL, que foram distribuídos para diferentes análises (Figura 5): 3 mL para polissacarídeos solúveis em água (WSP); 1 mL para eDNA; 0,5 mL para proteínas solúveis na matriz; e 6 mL para ALT. Do *pellet* ressuspenso em 2,55 mL de água, alíquotas foram usadas para diferentes análises (Figura 5): 1 mL para polissacarídeos insolúveis em água (solúveis em álcali - ASP); 50 μ L para teste de proteína total; 500 μ L para peso seco insolúvel; e 1 mL foi reservado.

4.2.1 Peso seco insolúvel dos biofilmes

As alíquotas de 0,5 mL de biofilme foram transferidas para recipiente de papel alumino pré-pesados em uma balança analítica (SHIMADZU - série AUW220D) e etiquetados. As amostras foram secas em um forno à 100°C. Após 4 h, os recipientes com as amostras secas foram pesados na balança novamente. A diferença entre o peso inicial e o final foi o peso seco da amostra. Esses valores foram utilizados para análise estatística (Figura 6).

Figura 6 - Esquema para quantificação do peso seco insolúvel do biofilme



500 μ L de biofilme adicionados em “barcos” de alumínios, foram pesados utilizando balança analítica (SHIMADZU - série AUW220D).

Fonte: Elaboração própria

4.2.2 Quantificação de proteínas totais do biofilme e da matriz extracelular

A quantificação de proteínas no biofilme (porção insolúvel) e na matriz (porção solúvel) foi realizada utilizando o método de Bradford, seguindo o protocolo para microplacas descrito no *Technical Bulletin* da SIGMA®

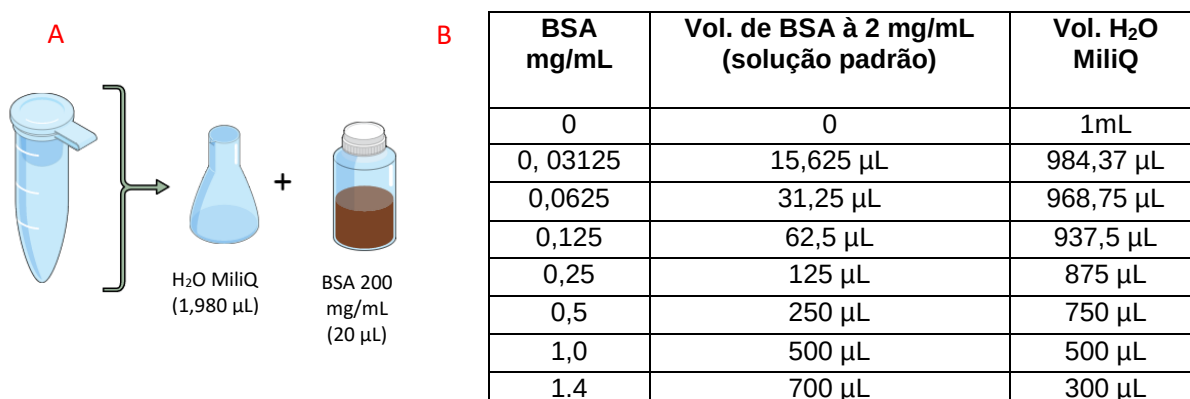
(http://www.chem.uky.edu/courses/che554/2_Photometry/SigmaBulletin_b6916bul.pdf).

A) Proteínas totais do biofilme

A alíquota de 50 µL do *pellet* de cada biofilme separada para proteína total foi diluída 1:5 com 200 µL de água MilliQ. As amostras foram incubadas em banho seco à 100°C, 1000 rpm por 1 h (980FIHSCTUs - *Fisher Scientific*); uma alíquota de cada amostra foi utilizada para verificar se havia células intactas *via* microscopia óptica. Para verificar a quantidade de proteínas foram utilizadas alíquotas de 5 µL de cada amostra em triplicata (em placa de 96 poços), que foram misturadas com 250 µL do reagente de Bradford.

Realizou-se curva padrão, utilizando-se padrão BSA (SIGMA) a 200 mg/mL, diluído à 2 mg/ml; e esta solução foi utilizada para construção dos pontos da curva como mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Desenho da curva padrão para quantificação das proteínas no biofilme



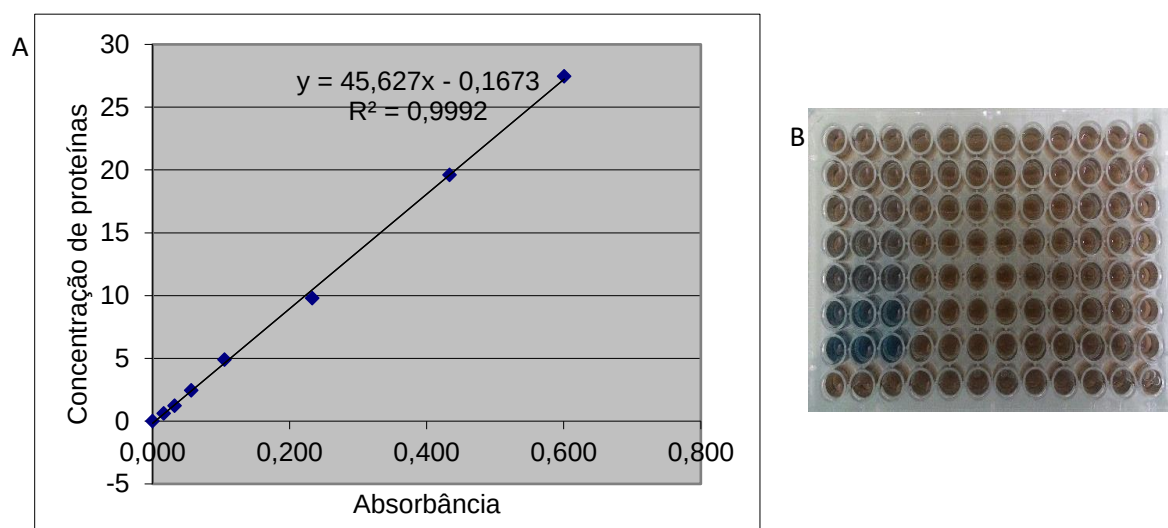
A. 20 µL de BSA a 200 mg/mL mais 1,980 µL de água foram misturados em um microtubo para elaboração da solução padrão; **B.** construção dos pontos da curva com a solução padrão de BSA e H₂O. Vol.: volume. BSA: *bovine serum albumin*.

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, alíquotas de 5 μL de cada amostra da curva foram colocadas na placa de 96 poços (a mesma contendo as amostras), seguido de adição de 250 μL de Bradford (sem diluição); cada placa foi colocada na incubadora orbital por 20 minutos a 37°C. A leitura de proteínas foi realizada em leitor de ELISA (Biochrom Ez read 400) com D.O._{595nm}.

Após a leitura, os valores da curva padrão foram plotados para obtenção de equação de reta e coeficiente de correlação. Se os dados da curva estavam dentro das normas (*slope*: 0,020-0,026; R^2 próximo a 1; ver exemplo na Figura 8), os valores de D.O. das amostras de biofilme foram convertidos em concentração de proteínas totais no biofilme.

Figura 8 - Curva padrão e escala colorimétrica para proteínas, usando o método de Bradford



A. Curva padrão para proteínas: Análise dos dados com D.O._{595nm} onde observamos correlação linear positiva (Absorbância vs. Concentração de proteínas). **B. Ilustração da escala colorimétrica:** Teste de Bradford, *slope* 0,020-0,026. A coloração azul na placa denota maior concentração de proteína. BSA: *bovine serum albumin*. D.O.: densidade óptica.

Fonte: Elaboração própria

B) Quantificação das proteínas na MEC

Para avaliar as proteínas na matriz, 500 μL do sobrenadante de cada amostra estavam reservados e 5 μL dos mesmos foram misturados com 250 μL de Bradford em placa de 96 poços (em triplicata).

A curva padrão de BSA foi construída como descrito acima, e 5 µL de cada ponto da curva padrão foram colocados em placa de 96 poços, e após foram adicionados 250 µL de Bradford (sem diluição), em triplicata. Em seguida, cada placa foi colocada na incubadora orbital por 20 minutos a 37°C. A leitura de proteínas foi realizada em leitor de ELISA (Biochrom Ez read 400) com D.O._{595nm}.

Após da leitura, os valores da curva padrão foram plotados para obtenção de equação de reta e coeficiente de correlação. Se os dados da curva estavam dentro das normas (*Slope*: 0,020-0,026; e o R^2 próximo a 1, ver exemplo na Figura 8), os valores de D.O. das amostras de sobrenadante de biofilme foram convertidos em concentração de proteínas na MEC.

4.2.3 Quantificação de eDNA na matriz extracelular

Para a extração do eDNA foi utilizado o *Kit MasterPure™ Purification (EPICENTRE)*, com os seguintes passos:

Após descongelar 0,5 mL de amostra de sobrenadante reservados para isolar eDNA, adicionou-se o mesmo volume de 2X TCL (reagente do kit), seguido de incubação à 65°C durante 15 min, sob leve agitação 300 rpm (Banho seco - *Fisher Scientific*). As amostras foram resfriadas na geladeira por 15-20 min, e foram adicionados 150 µL de MPC (reagente para precipitação de proteínas) às amostras, seguido de agitação. As amostras foram centrifugadas (12000 rpm /10 min /4°C – centrífuga 5430R, Eppendorf); e o sobrenadante transferido para um tubo novo. Aos sobrenadantes foram adicionados 1000 µL de isopropanol, seguido de agitação por inversão dos tubos (40 vezes) e precipitação em *freezer* a -20°C (*overnight*, por no mínimo 18 h).

No dia seguinte, o conteúdo foi centrifugado (12000 rpm, 20 min, 4°C - centrífuga 5430R, Eppendorf) e o isopropanol descartado, sem desalojar o *pellet* de cada amostra; as amostras foram enxaguadas com etanol 75% (200 µL), seguidas de centrifugação (12000 rpm / 5 min - centrífuga 5430R, Eppendorf). O etanol foi descartado sem desalojar o *pellet* (este passo foi repetido duas vezes). O etanol foi removido e os tubos foram deixados para secar na bancada por 20 min; então, adicionou-se 30 µL de TE (Tris-EDTA; pH 8,0) aos tubos. Após a hidratação do eDNA,

o mesmo foi quantificado à 260 nm usando nano-espectrofotômetro (DS-11+, Denovix; Figura 9). Os dados de eDNA foram utilizados para análise estatística.

Figura 9 - Quantificação de eDNA



Utilizando o nanoespectrofotômetro (DS-11+, Denovix), quantificou-se o eDNA encontrado na matriz dos biofilmes, adicionando 1,5 μ L da amostra e leitura a 260 nm. Leituras realizadas em duplicata. O *Blank* utilizado foi TE.

Fonte: Elaboração própria

4.2.4 Detecção e quantificação de ALT na matriz extracelular

Este procedimento foi realizado em três etapas: 1) elaboração de curva padrão de ALT via isolamento de ALT de cultura de *S. mutans* (cepa parental); 2) processamento do sobrenadante dos biofilmes reservados para isolamento de ALT da matriz extracelular (nas idades de 67 e 115 h); e 3) quantificação de ALT via ELISA (método indireto).

- *Elaboração de curva padrão de ALT*

A curva padrão de ALT foi obtida segundo a metodologia proposta por Sutcliffe e Hogg¹¹² (1993), com algumas modificações. Pré-inóculo da cepa parental *S. mutans* UA159 foi realizado em meio de cultura TY com 1% de glicose, conforme descrito no item “Procedimento para preparo dos biofilmes”. Após 18 h de incubação (37°C e 5% de CO₂), o inóculo foi preparado misturando 40 mL do pré-inóculo com 760 mL de meio de cultura TY com 1% de glicose. A garrafa contendo 800 mL de inóculo foi incubada até a obtenção da D.O._{540nm} $\pm$ 1.0 (~ 4 h / 37°C e 5% de CO₂).

Após, verificou-se a ausência de contaminação via microscopia. Essa cultura foi distribuída em alíquotas de 30 mL em tubos tipo Falcon de 50 mL para centrifugação (4000 rpm / 15 min, centrífuga 5810R, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado.

Os *pellets* foram lavados através da ressuspensão dos mesmos com 10 mL de NaCl 0,89%, seguido de centrifugação (4000 rpm / 15 min, centrífuga 5810R, Eppendorf). Os sobrenadantes foram descartados, e os *pellets* resuspensores com 10 mL de NaCl 0,89%. Essas suspensões de células foram incubadas em banho maria (20 min / 100°C, Branson 3800). Após incubação, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm / 15 min / 4°C, centrífuga 5810R, Eppendorf), os sobrenadantes descartados, e os *pellets* lavados duas vezes com o mesmo volume de NaCl 0,89% e mesmos parâmetros de centrifugação. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados uma vez com H₂O MilliQ (10 mL) e centrifugados (4000 rpm / 15 min / 4°C, centrífuga 5810R, Eppendorf). Novamente os sobrenadantes foram descartados.

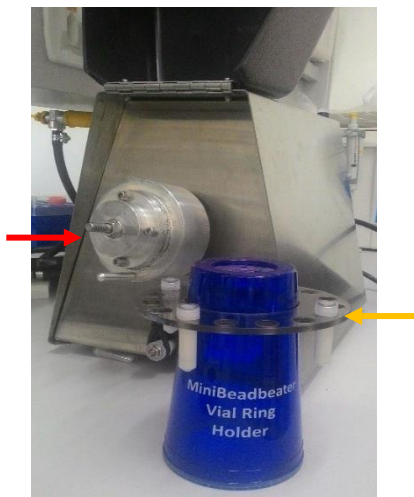
Os *pellets* foram lavados três vezes com 5 mL acetona e centrifugação (4000 rpm / 15 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram todos combinados em um único tubo. O *pellet* resultante foi seco à 37°C (*overnight*), transformando assim em pó branco. Esse pó foi pesado, utilizando uma balança de alta precisão (Mettler AE 50). A quantidade obtida de pó foi 0,09848g, ao qual foram adicionados 9,848 mL de água MilliQ gelada.

Essa suspensão foi separada em partes iguais em tubos para disruptor mecânico (Minibeadbeater, Biospec Products, Figura 10), contendo bolinhas de vidros até a marca 0,5 mL de cada tubo. Os tubos foram colocados no suporte de amostras de modo equidistante, e as amostras agitadas por 15 min.

Após a homogeneização, a suspensão foi filtrada utilizando papel (10-15M Pyrex) e um funil para remover as bolinhas de vidros, e o líquido foi coletado em um tubo tipo Falcon de 15 mL. Esse líquido foi centrifugado (1500 g / 10 min; 4°C, centrífuga 5810R, Eppendorf). O *pellet* resultante contém células intactas (que não foram rompidas durante o processamento com MiniBeadBeater); já o sobrenadante contém componentes da parede celular das células rompidas e foi submetido à nova

centrifugação (6500 g / 30 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf), para assim obter *pellet* contendo os componentes da parede celular.

Figura 10 - Minibeadbeater - Biospec Products



Os tubos com as amostras estão posicionados no suporte de amostras (acrílico fumê – indicado pela seta na cor laranja), que é posicionado no eixo metálico (indicado pela seta na cor vermelha), para homogeneização da amostra e disrupção mecânica das células.

Fonte: Elaboração própria

Esse *pellet* obtido foi lavado três vezes com água MilliQ (5 ml) utilizando centrifugações (6500 g / 10 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). O *pellet* resultante foi resuspenso em 9,84 mL de 50 mM PBS (tampão fosfato, pH 7,6, esterilizado por filtração). À essa solução foram adicionados 8,4 µL de RNase A (para atingir concentração final de 100 µg/mL; Sigma R4875), 5 µL de DNase I (para atingir concentração final de 50 µg/mL; Sigma D4527) e 19,68 µL de tolueno (Sigma). Essa solução foi incubada (18 h / 37°C; incubadora orbital, Quimis G816M20).

Após a incubação, a solução foi centrifugada (6500 g / 30 min / 4°C Centrífuga 5810R, Eppendorf). O *pellet* foi lavado quatro vezes utilizando 1 mL de H₂O MilliQ, e secado em um concentrador de amostras (modelo RVC 2-18C D, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). O pó resultante foi armazenado em freezer -80°C, até o uso.

É preconizado a adição de 250 mL de ácido tricloroacético à 5% (TCA; Sigma) por cada 1 g desse *pellet*, com incubação (18 h / 22°C) sob agitação, utilizando um

homogeneizador (Fisher Scientific). Portanto, o conteúdo de pó neste estudo foi de 0,0984 g, ao qual foi adicionado 24,6 mL de TCA à 5%.

Após a incubação, a solução foi centrifugada (6500 g / 30 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf), e o sobrenadante (Sobrenadante 1) armazenado até a sua utilização. Já o *pellet* foi submetido à nova extração com 15,744 mL de TCA à 5%. A solução foi homogeneizada usando vórtex, e centrifugada (6500 g / 30 min; centrífuga 5810R, Eppendorf).

O sobrenadante (Sobrenadante 2) foi armazenado até a sua utilização e o *pellet* foi submetido à nova extração com 9,84 mL de TCA à 5%. Essa nova solução foi homogeneizada usando vórtex, e centrifugada usando os mesmos parâmetros da centrifugação anterior. O *pellet* resultante é peptidoglicano isolado e foi armazenado (*freezer* -20°C), e o sobrenadante resultante (sobrenadante 3) foi armazenado até a sua utilização.

Os sobrenadantes 1, 2 e 3 (24,6 mL + 15,744 mL + 9,84 mL = 50,184 mL) foram misturados e utilizados para recuperar ALT. O volume foi dividido em quatro tubos tipo Falcon de 50 mL, sendo o total de 12,546 mL para cada tubo. Foram adicionados 150,552 mL de éter etílico (SIGMA), resultando em volume total de 37,63 mL em cada tubo. As amostras dos dois tubos foram centrifugadas (6500 g / 30 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). Essa etapa de centrifugação separou as amostras em duas fases: uma fase aquosa e outra oleosa. O ALT está na fase aquosa, e a mesma foi cuidadosamente removida e transferida para novos tubos. A fase oleosa foi descartada. Foram realizadas três extrações do sobrenadante com adição de éter etílico e centrifugação (mesmos parâmetros da centrifugação anterior), resultando em 3 volumes de fase aquosa (separados em 3 tubos), aos quais foram adicionados três volumes de acetona (40,74 mL), seguido de incubação (4°C / 24 h).

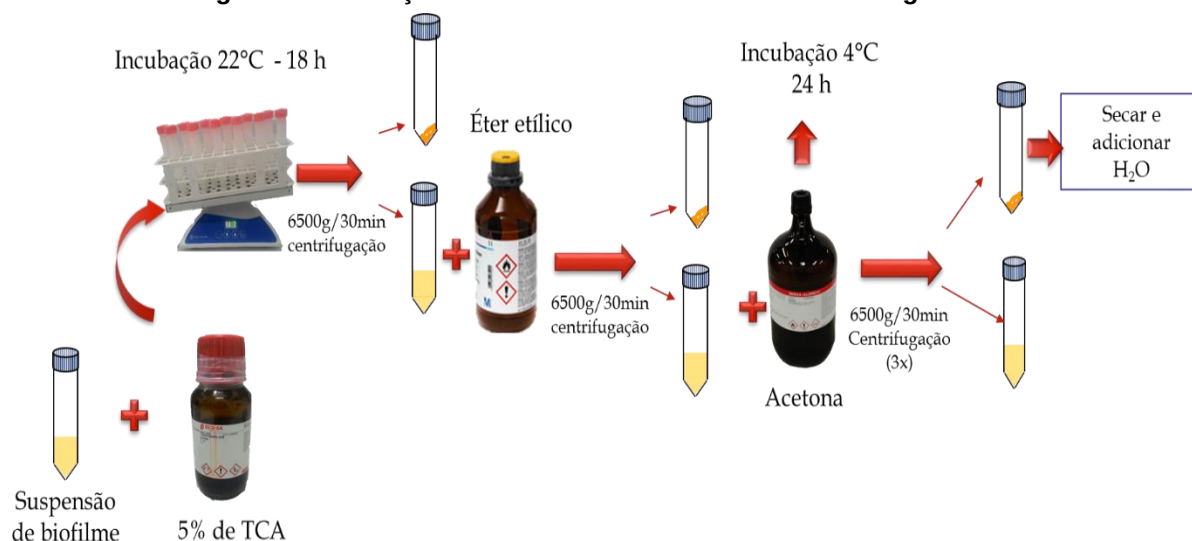
Em seguida, as amostras foram centrifugadas (6500 g / 30 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram lavados três vezes com acetona, utilizando cada vez 5 mL de acetona e centrifugação (6500 g / 5 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). Os *pellets* foram combinados em um único tubo, usando acetona, seguido de centrifugação (com os mesmos parâmetros da centrifugação anterior). O *pellet* resultante foi secado sobre bancada por 10 min, e

resuspenso com 1 mL de H₂O MilliQ. Essa amostra foi armazenada no freezer -80°C até a sua quantificação utilizando ELISA.

- Processamento do sobrenadante dos biofilmes para isolamento de ALT da matriz extracelular

Terminada a curva padrão para extração de ALT, realizamos preparação das amostras de ALT da matriz extracelular de cada biofilme, como descrito a seguir. Dos sobrenadantes guardados para extração de ALT, foram utilizadas 3 mL de cada amostra, aos quais foram adicionados 150 µL de TCA (Sigma), resultando em concentração final de 5% de TCA. Essas amostras foram incubadas (22°C / 18 h) sob agitação (homogeneizador; Fisher Scientific; Figura 11).

Figura 11 - Extração de ALT da matriz de biofilmes cariogênicos



Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante de biofilmes foi misturada com 150 µL de TCA (Solução final com 5% TCA), os tubos foram deixados incubados durante 18 h a 22°C (homogeneizador); em seguida foram realizadas duas centrifugações (6500 g / 30 min, 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf); adicionando éter e acetona aos sobrenadantes, respectivamente. As amostras foram incubadas por 24 h a 4°C e finalmente centrifugadas (6500 g / 30 min, 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf), o *pellet* obtido foi seco e H₂O foi adicionada, ficando pronto para a quantificação via ELISA.

Fonte: Elaboração própria

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (6500 g / 30 min, 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf), o sobrenadante foi coletado em um tubo tipo Falcon de 50 mL e armazenado. O *pellet* foi resuspendido com 6 mL de éter etílico (Sigma), seguido de nova centrifugação usando os mesmos parâmetros anteriores. O *pellet* foi

descartado e sobrenadante foi transferido para o mesmo tubo tipo Falcon de 50 mL contendo o sobrenadante inicial. A este sobrenadante foram adicionados três volumes de acetona, seguido de incubação (4°C / 24 h). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (6500 g / 30 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf), e os *pellets* foram lavados três vezes com acetona (5 mL), e centrifugados (6500 g / 5 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). Os *pellets* foram secos sobre bancada por 10 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL de H₂O MilliQ. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até a sua quantificação utilizando ELISA.

- Quantificação de ALT via ELISA (método indireto)

Para a quantificação de ALT via ELISA (método indireto) foram realizadas três etapas: 1) imobilização de antígeno (ALT) em microplaca; 2) incubação de antígeno com anticorpos primário e secundário; e 3) detecção de ALT por absorbância.

- ✓ Imobilização de antígeno (ALT) em microplaca

Para a curva padrão, foi realizada diluição seriada de 1:1 até 1:1000 do ALT purificado de cultura planctônica de *S. mutans* UA159 (curva padrão, anteriormente explicada). Foram transferidos para microplacas de 96 poços (*Corning Incorporated-Costar*, 3599) 50 µL de cada ponto da curva padrão e 50 µL de amostra (ALT isolado na matriz) em poços correspondentes seguindo o mapa planejado para cada placa.

As placas foram tampadas, vedadas com parafilme, e incubadas (4°C / 18 h). Terminada a incubação, o líquido remanescente das amostras foi removido por inversão das placas sobre recipiente de descarte e o excesso foi removido tocando cada placa sobre papel absorvente. As placas foram lavadas três vezes com 200 µL de 1xPBS com 0,2% de Tween 20 (por poço), utilizando pipetador multicanal.

A solução de lavagem foi removida por inversão sobre recipiente de descarte, e o excesso de líquido foi removido através do posicionamento de cada placa invertida sobre papel absorvente. Os sítios de ligação presentes nas amostras de ALT imobilizado foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio (BSA 2%). As placas foram tampadas, vedadas com parafilme, e incubadas (temperatura ambiente / 2 h).

Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com 200 μ L de 1xPBS com 0,2% de Tween 20 (por poço), utilizando pipetador multicanal. A solução de lavagem foi removida por inversão sobre recipiente de descarte, e o excesso de líquido foi removido através do posicionamento de placa invertida sobre papel absorvente.

✓ Incubação com anticorpos primário e secundário

Em cada poço das placas foram adicionados 100 μ L de anticorpo primário diluído 1:200 vezes – *Gram Positive Bacteria LTA Antibody* (Cat. # MA1-7402, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). As placas foram tampadas, vedadas com parafilme, e incubadas (4°C / 18 h). A solução remanescente foi removida por inversão das placas sobre recipiente de descarte e o excesso de líquido foi removido tocando cada placa sobre papel absorvente. As placas foram lavadas quatro vezes com 200 μ L de 1xPBS com 0,2% de Tween 20 (por poço), utilizando pipetador multicanal. A solução de lavagem foi removida por inversão sobre recipiente de descarte, e o excesso de líquido foi removido através do posicionamento de placa invertida sobre papel absorvente.

Em cada poço das placas foram adicionados 100 μ L de anticorpo secundário *Goat anti-Mouse IgG (H+L, conjugado com HRP, cat. # A16072, Invitrogen, ThermoFisher Scientific)*, diluído 1:2.000 vezes, seguindo as orientações do fabricante. As placas foram tampadas, vedadas com parafilme, e incubadas (temperatura ambiente / 2 h). As placas foram lavadas duas vezes com 200 μ L de 1xPBS com 0,2% de Tween 20 (por poço), utilizando pipetador multicanal. A solução de lavagem foi removida por inversão sobre recipiente de descarte, e o excesso de líquido foi removido através do posicionamento de placa invertida sobre papel absorvente.

✓ Detecção de ALT

Em cada poço das placas foram adicionados 100 μ L de peróxido de hidrogênio a 30% (Sigma). As placas foram tampadas, vedadas com parafilme, e incubadas (temperatura ambiente / 4 h). Em seguida, a absorbância (405 nm) foi verificada com um leitor de ELISA (EZ Read 400 biochrom). Os dados de absorbância foram verificados e anotados.

4.2.5 Exopolissacarídeos solúveis em água (WSP) na matriz extracelular

Para a quantificação de exopolissacarídeos solúveis em água, ao total de 3 mL de sobrenadante de cada biofilme, foram adicionados 7,5 mL de etanol a 99.3%. Os tubos foram armazenados em *freezer* a -20°C durante no mínimo 18 h para precipitação de WSP. Os tubos foram centrifugados (9.000 rpm / 20 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de etanol a 70%, e as paredes do tubo foram “raspadas” com a ponta de uma ponteira para misturar bem os polissacarídeos. Os tubos foram centrifugados novamente (9.000 rpm / 20min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). O etanol foi descartado e este passo foi repetido duas vezes. Após as lavagens, os tubos foram virados abertos sobre papel absorvente e deixados em bancada para secar por 20 min. Então, adicionou-se 1 mL de água Milli-Q e os tubos foram guardados em geladeira até a realização do ensaio colorimétrico, proposto por Dubois et al.²⁵, (1956).

Para esse ensaio, curvas padrão de glicose foram realizadas, utilizando água e glicose a 0,1%, em tubos de ensaio de vidro (16 x 100 mm). As concentrações de glicose utilizadas e volumes correspondentes estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Curva padrão de glicose para quantificação de WSP

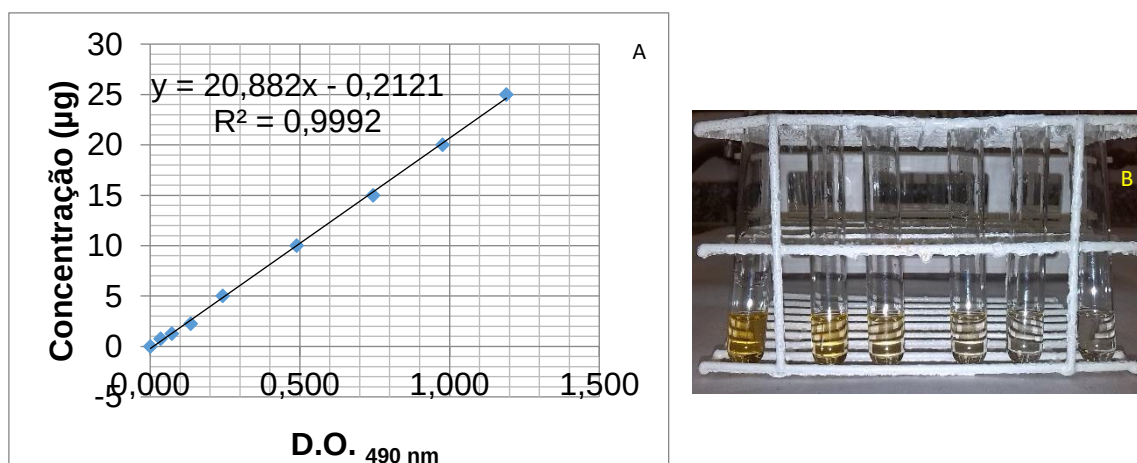
Volume (µL)	Concentração de glicose (µg)								
	0	0,75	1,25	2,50	5	10	15	20	25
Água	200	199,25	198,75	197,5	195	190	185	180	175
Glicose 0,1%	0	0,75	1,25	2,50	5	10	15	20	25
Total	200	200	200	200	200	200	200	200	200

Fonte: Elaboração própria

Dentro de uma capela de exaustão de gases, com o auxílio de dispensador de repetição (Eppendorf), adicionou-se 200 µL de fenol 5% (fresco), seguido de homogeneização e adição de 1000 µL de ácido sulfúrico em cada tubo de vidro contendo as amostras de cada ponto da curva. O último foi adicionado sob agitação. Os tubos foram mantidos dentro da capela de exaustão de gases por 20 min (tempo necessário para finalização da reação bioquímica). Em seguida, o líquido dos tubos de vidro foi transferido para cubeta descartável de polipropileno, sendo a leitura da

D.O._{490nm} via espectrofotômetro (SP – 220 BIOSPECTRO) realizada imediatamente. Os dados da curva padrão foram analisados. Nunca os procedimentos para a análise das amostras foram iniciados sem que os dados da curva se encontrassem dentro das normas (*Slope*: 0,048-0,051; e o R^2 o mais próximo a 1; ver exemplo na Figura 12).

Figura 12 - Curva padrão para exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis em água (ASP)



A. Exemplo de curva padrão para WSP e ASP: Análise dos dados com D.O._{490nm} onde observa-se correlação linear positiva. **B. Escala colorimétrica:** Ensaio fenol-ácido sulfúrico, *slope* 0,048-0,051.

Fonte: Elaboração própria.

Terminada a calibração, foram feitas as análises dos biofilmes em tubos de vidros contendo 200 µL de amostra. Como realizado para obtenção da curva padrão, volumes correspondentes de fenol 5% e ácido sulfúrico foram adicionados a cada tubo contendo as amostras. Os valores de DO_{490nm} foram verificados e anotados, pois os mesmos foram convertidos em concentração de WSP utilizando-se a equação de reta gerada em cada curva realizada para cada experimento específico. Em seguida, o cálculo do total de WSP em cada biofilme foi realizado, e esses dados foram utilizados para análise estatística.

4.2.6 Exopolissacarídeos insolúveis em água (ASP) na matriz extracelular

Para exopolissacarídeos insolúveis em água o total utilizado foi de 1 mL de suspensão de cada biofilme. Este conteúdo foi centrifugado (10.000 rpm / 15 min / 4°C; centrífuga 5810R, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco

por 2 h e meia em um concentrador de amostras (modelo RVC 2-18C D, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). O *pellet* foi pesado em balança de alta precisão (Metteler AE 50) e o peso registrado.

Os *pellets* foram transferidos para novos microtubos tipo eppendorf. De acordo com o peso de cada *pellet*, adicionou-se 300 µL de NaOH 1 M por mg de peso seco em cada tubo. O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado (vórtex) e incubado em incubadora orbital (37°C / 10 min). Após este, período foi verificado se cada *pellet* estava dissolvido, seguido de incubação a 37°C por mais 2 h (com 30 min de incubação, foi feita agitação ao vórtex novamente), os tubos foram centrifugados (12000 rpm / 10 min; centrífuga 5430R, Eppendorf) e o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um tubo tipo Falcon limpo de 15 ml.

Novamente, foram adicionados 300 µL de 1M NaOH para cada mg de peso seco do *pellet* em os microtubos tipo eppendorf utilizados anteriormente. Seguido de agitação em vórtex e incubação como realizado inicialmente. Após essa segunda incubação, os microtubos foram centrifugados (12000 rpm / 10 min centrífuga 5430R, Eppendorf) e o sobrenadante de cada amostra foi transferido para os tubos tipo Falcon utilizado para a amostra correspondente. Os procedimentos foram repetidos novamente, porém sem a incubação por 2 h. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido no tubo tipo Falcon utilizado por amostra e o *pellet* de cada amostra foi descartado. Foram adicionados 3 volumes de etanol 75% aos tubos, o conteúdo foi misturado vigorosamente e deixado incubado em *freezer* -20°C por no mínimo 18 h para a precipitação de ASP.

Após o período de precipitação, as amostras foram removidas do *freezer*, homogeneizadas e centrifugadas (9500 rpm / 20 min / 4°C; centrífuga modelo 5810R, Eppendorf). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram lavados três vezes com etanol 75%, sendo o *pellet* ressuspenso com 7 mL de etanol 75%, e uma alça de inoculação descartável foi utilizada para raspar ASP de cada amostra aderido à parede do tubo para garantir a ressuspensão. Em seguida, as amostras foram agitadas (Vortex), e centrifugadas (9500 rpm / 20 min / 4°C - Centrífuga 5810R, Eppendorf). Os sobrenadantes foram descartados e as amostras foram deixadas sobre bancada para secar durante 15-20 minutos (tempo necessário para a evaporação do etanol).

Cada *pellet* foi ressuspensionado com NaOH 1M (o mesmo volume total da extração inicial), os tubos foram guardados em geladeira (4°C) até a realização do ensaio colorimétrico de Dubois et al.²⁵. (1956), como descrito para WSP, com algumas modificações descritas a seguir.

As curvas padrão de glicose foram realizadas, utilizando água, glicose a 0,1% e NaOH 1M em tubos de ensaio de vidro, com as concentrações e volumes mostrados na Tabela 2 (em duplicata). A cada tubo foram adicionados 200 µL de fenol a 5%, seguido de homogeneização e adição de 1000 µL de ácido sulfúrico em cada tubo de vidro, do mesmo modo como descrito para WSP. Depois de 20 min na capela de exaustão de gases (tempo para finalização da reação bioquímica), realizou-se a leitura da DO_{490nm}. Verificou-se os dados da curva padrão. Os procedimentos somente foram iniciados após os dados da curva estarem dentro das normas (*Slope*: 0,048-0,051; e o R² o mais próximo a 1; ver exemplo na Figura 12).

Tabela 2 - Curva padrão de glicose para quantificação de ASP

Volume (µL)	Concentração de glicose (µg)								
	0	0,75	1,25	2,50	5	10	15	20	25
Água (µL)	160	159,25	158,75	157,5	155	150	145	140	135
Glicose 0,1% (µL)	0	0,75	1,25	2,50	5	10	15	20	25
NaOH 1 N (µL)	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Total (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200

Fonte: Elaboração própria.

Terminada a calibração, foram feitas as análises dos biofilmes em tubos de vidros contendo 40 µL de cada amostra com 160 µL de água MiliQ, e adicionou-se o fenol e o ácido sulfúrico da mesma forma que foi feita para a obtenção da curva padrão. Os valores de D.O._{490nm} foram verificados e anotados, pois os mesmos foram convertidos em concentração de ASP utilizando-se a equação de reta gerada em cada curva realizada para cada experimento específico. Em seguida, o cálculo do total de ASP em cada biofilme foi realizado, e esses dados foram utilizados para análise estatística.

4.3 Análise da estrutura 3D de biofilmes usando microscopia confocal

Foram desenvolvidos biofilmes monespécie com idade 115 h para análise da morfologia 3D e organização estrutural desses biofilmes. Para marcação de EPS na MEC, foi usado um método baseado na incorporação de dextranos marcados com Alexa Fluor® 647 (fluorescentes; 10 kDa - absorbância / fluorescência máximos de emissão de 647/668 nm; *Molecular Probes, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA*) pelas enzimas Gtfs durante a formação de exopolissacarídeos (glicanos) (Klein et al.^{52, 54}, 2009, 2011). Assim, para a visualização da matriz adicionou-se 13,4 µL desse dextrano fluorescente (1µM) em 2,8 mL de meio de cultura a partir do início (0 h) e durante o desenvolvimento dos biofilmes (diferentes idades descritas no desenho experimental Figura 2). Na idade 115 h, SYTO® 9 foi utilizado para marcar as bactérias nos biofilmes. Para tanto, os discos foram tirados da placa com meio de cultura e enxaguados com NaCl 0,89%, e transferidos para poços contendo 1,5 µL de SYTO® 9 (485/498 nm; *Molecular Probes*) e 2,8 mL de NaCl 0,89%. Os biofilmes foram incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos, enxaguados três vezes utilizando NaCl 0,89%, e deixados nesta mesma solução a temperatura de 4°C até a realização de análises microscópicas.

As imagens foram adquiridas utilizando microscopia confocal de varredura à laser (microscópio Leica TCS SP). Esse microscópio estava equipado com uma lente objetiva de 20X. Cada biofilme foi examinado em 2 posições selecionadas aleatoriamente. Uma série de imagens confocais foram gerados por corte óptico em cada uma destas posições. Essas imagens foram analisadas usando software AMIRA 6.0.1 (Mercury Computer Systems Inc., Chelmsford, MS) para criar representações tridimensionais de cada componente estrutural (EPS e bactérias) dos biofilmes para a visualização da morfologia e arquitetura 3D conforme descrito anteriormente (Klein et al.^{52, 54}, 2009, 2011).

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados para examinar se existem diferenças entre os biofilmes formados por cada cepa mutante e a cepa parental de *S. mutans* em biofilmes monoespécies e mistos, usando o software Prism 7 (GraphPad Software, Inc., 2016). Os dados obtidos nos experimentos in vitro foram organizados em banco de dados e analisados com o auxílio de tratamentos estatísticos adequados de acordo com a distribuição (homogeneidade e homocedasticidade). Em seguida, os dados foram analisados por ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), ou ANOVA dois critérios. Ainda, foram realizadas análises de correlação de Person para: ASP vs. biomassa (APÊNDICES A e B) e WSP vs. biomassa (APÊNDICES C e D).

5 RESULTADOS

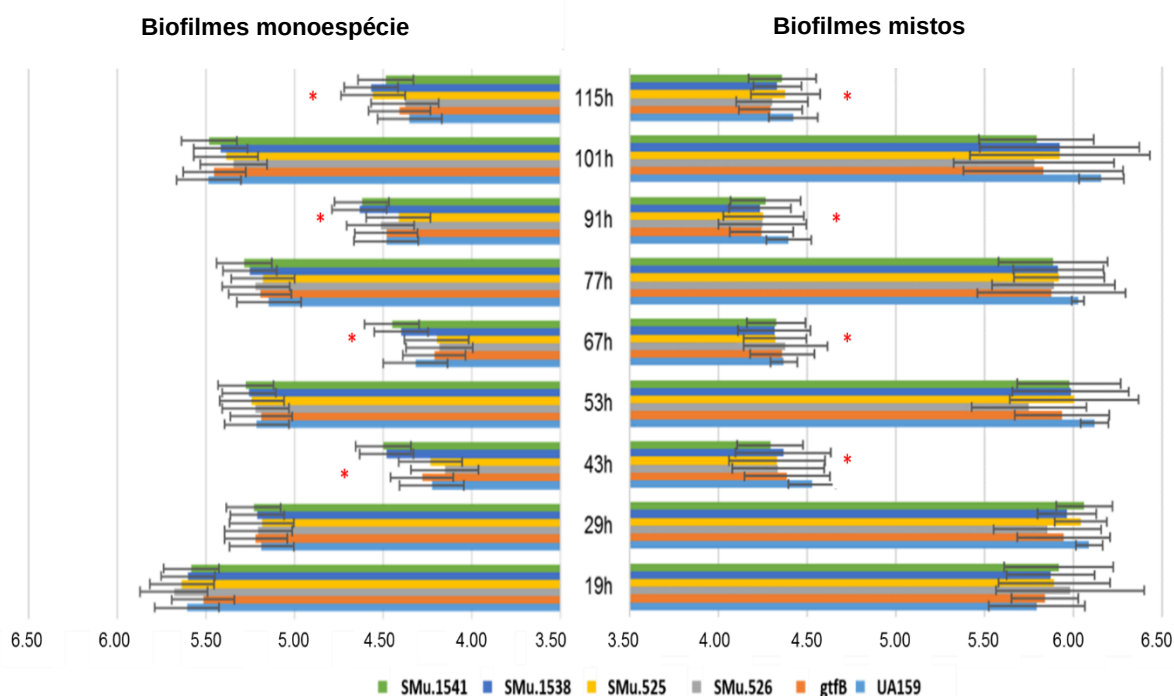
Foram avaliados os componentes da matriz extracelular em biofilmes monoespécie de *S. mutans* UA159 (cepa parental) e mutantes *knockout* e mistos (*S. mutans* UA159 ou mutantes *knockout*, *A. naeslundii* ATCC 12104 e *S. gordonii* DL-1). Ainda, foram avaliados o pH do meio de cultura, a população microbiana, e a biomassa dos biofilmes, além da estrutura 3D dos biofilmes.

5.1 Análise de biofilmes monoespécie e mistos

5.1.1 pH de meios de cultura de biofilmes monoespécie e mistos

Os valores de pH de meio de cultura em biofilmes mistos e monoespécie foram avaliados durante o desenvolvimento dos biofilmes (Figura 13), nas idades de 19, 29, 43, 53, 67, 77, 91, 101 e 115 h. Os valores em 43, 67, 91 e 115 h são significativamente menores quando foram comparados com 19 h, para os biofilmes mistos e monoespécie. Os valores para essas 4 idades de biofilme foram em média abaixo de 5,5, que é o pH considerado crítico para a desmineralização do esmalte dentário.

Figura 13 - pH dos meios de cultura de biofilmes monoespécie e mistos



Do lado esquerdo do gráfico estão os dados dos biofilmes monoespécies e do lado direito do gráfico estão os dados dos biofilmes mistos. As idades avaliadas foram 19, 29, 43, 53, 67, 77, 91, 101 e 115 h. Observa-se o pH mais ácido nas idades 43, 67, 91 e 115 h para todas as cepas de *S. mutans* avaliadas—parental e mutantes (* $p < 0,05$, ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey).

Fonte: Elaboração própria

5.1.2 População microbiana dos biofilmes

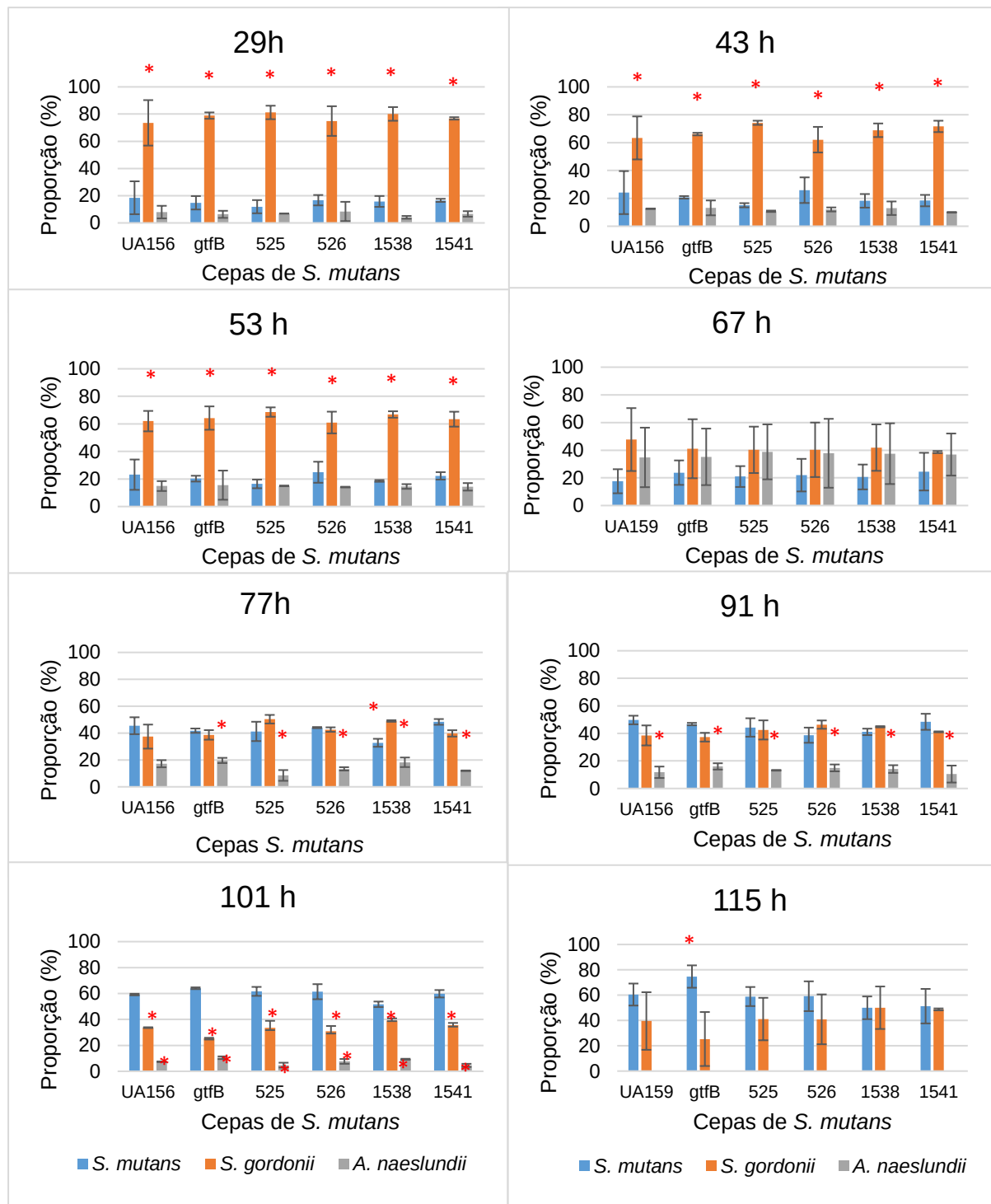
A população microbiana dos biofilmes mistos foi analisada nas idades 29, 43, 53, 67, 77, 91, 101 e 115 h. Para os biofilmes monoespécie, as análises de população foram realizadas nas idades 67 e 115 h, que também foram as fases do processamento desses biofilmes para as demais avaliações realizadas.

- **Dinâmica populacional nas diferentes idades do biofilme misto**

As proporções das três espécies nas diferentes idades foram geralmente similares (Figura 14). Nas idades 29 h, 43 h, e 53 h ocorre uma proporção significativamente maior de *S. gordonii* ($p < 0,05$; ANOVA dois critérios, seguido de teste de Tukey). O aumento na espécie *S. gordonii*, poderia ser atribuído à produção de peróxido de hidrogênio produzido por *S. gordonii*, o que faz com que diminua a proporção de *S. mutans* no biofilme (Kreth et al.⁶¹, 2008). Na idade 67 h, as espécies foram proporcionalmente similares em cada biofilme, e na idade de 77 e 91 h, só a espécie *A. naeslundii* foi significativamente menor em relação às demais espécies; na idade de 101 h *S. mutans* foi significativamente maior e finalmente com 115 h *S. mutans* tornou-se a espécie dominante.

As três espécies foram detectadas em todas as idades de biofilmes formados com cepas *S. mutans* parental e mutantes, exceto às 115 h, quando a espécie *A. naeslundii* não foi detectada, por limitações do método de cultura utilizado. A dinâmica populacional das espécies mostra que *S. gordonii* foi a espécie mais prevalente nas idades iniciais (29 – 53 h), que pode ser explicado pela produção de peróxido de hidrogênio para conseguir um lugar na aderência de microrganismos. Porém, após da idade de 67 h houve um aumento de *S. mutans*, enquanto houve uma diminuição de *S. gordonii* e um decréscimo drástico da espécie *A. naeslundii* (Figura 15).

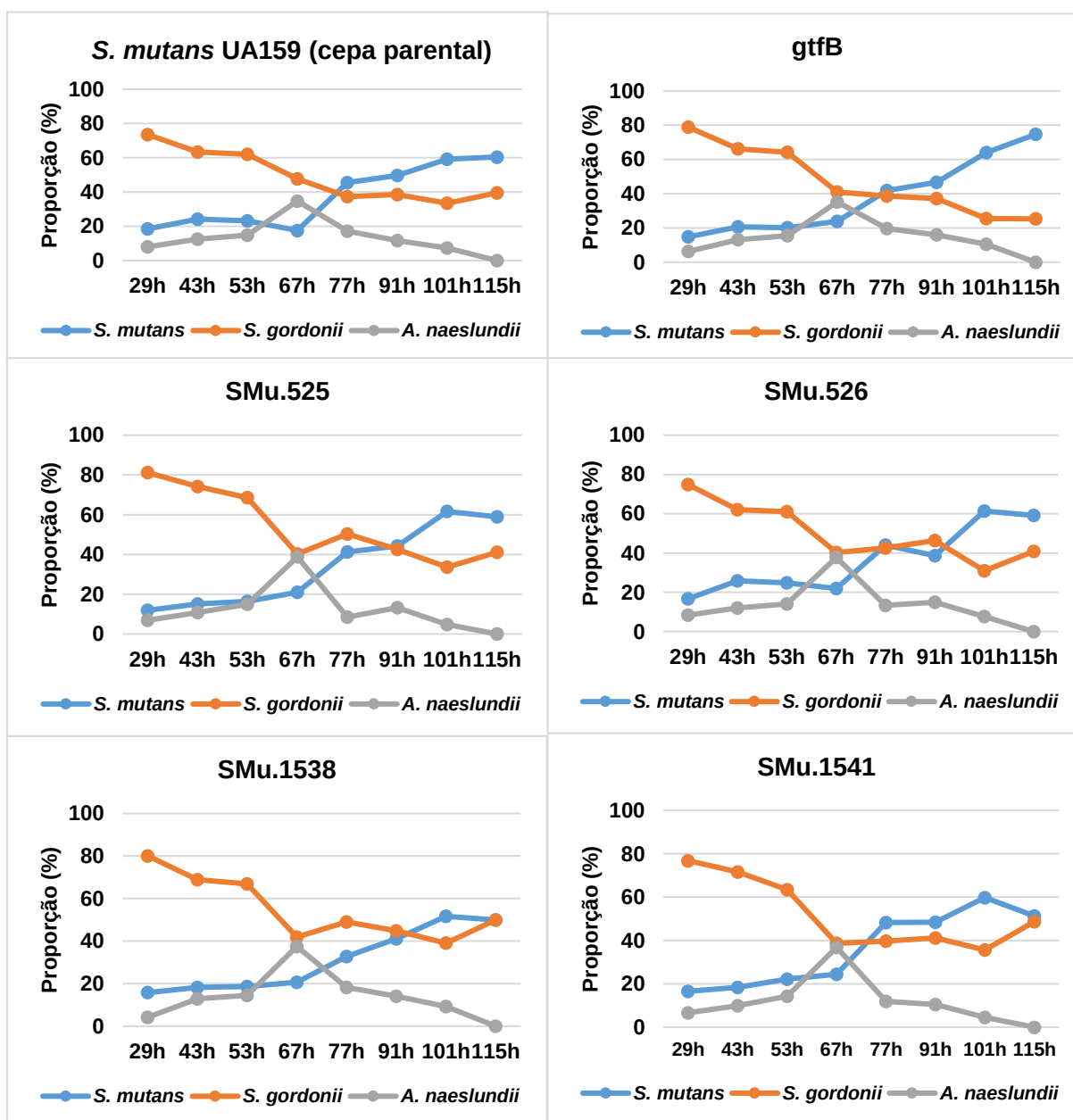
Figura 14 - Proporção das três espécies em biofilmes mistos em diferentes idades do biofilme



Os dados apresentados são de pelo menos três experimentos, realizados em duplicata. Nas idades 29, 43, 53 h a espécie *S. gordonii* foi dominante, não houve diferenças na idade 67 h. Em 77 e 91 h *A. naeslundii* foi significativamente menor vs. *S. gordonii*, já em 101 h *S. gordonii* e *A. naeslundii* foram menores do que *S. mutans*. Na idade de 115 h a cepa *ΔgtfB* foi maior vs. *S. gordonii*. O asterisco *denota $p < 0,05$, usando ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey, na comparação entre as três espécies em cada biofilme misto em uma determinada idade do biofilme. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria

Figura 15 - Dinâmica da população das diferentes cepas testadas em várias fases de formação de biofilmes mistos



Análise longitudinal da população das diferentes espécies.

Fonte: Elaboração própria

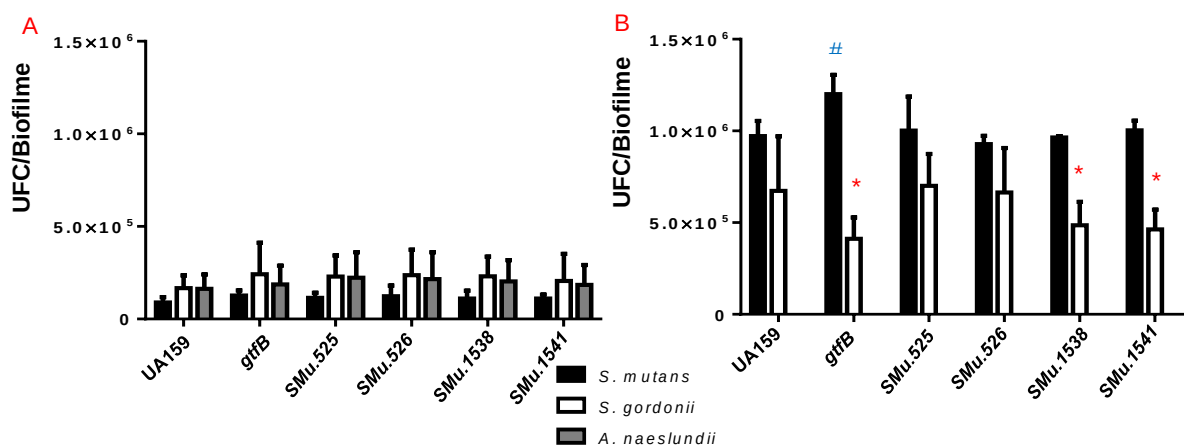
Portanto, nas idades iniciais dos biofilmes mistos, *S. mutans* não foi a espécie predominante, mas após a idade 67 h tornou-se o habitante majoritário, independentemente da modulação de componentes da MEC. Assim, 67 h pode ser

considerada uma fase de transição que poderia ser chave para o desenvolvimento do biofilme e propiciar a sua maturação com o tempo (no modelo in vitro utilizado).

- **Comparação das idades de 67 e 115 h dos biofilmes monoespécie e mistos**

Na idade 67 h, biofilmes mistos formados por cada cepa mutante *knockout* mostraram um comportamento similar comparados com a cepa parental UA159 (Figura 16A); *S. mutans* pode não ser a espécie predominante, mas é a espécie mais cariogênica (Tanzer et al.¹¹⁶, 2012), e com o passar do tempo e condições ambientais adequadas pode se tornar a espécie majoritária na população, como é verificada em 115 h.

Figura 16 - Valores de UFC nos biofilmes mistos com 67 h (A) e 115 h (B)



Não existe diferença nos valores de UFC detectados para todas as cepas estudadas na idade de 67 h (A) ($p > 0.05$). Na idade 115 h (B) são representados, UFC de *S. mutans* e de *S. gordonii* nos biofilmes mistos formados pela cepa parental UA159 e as mutantes *knockout*; (#) nesses biofilmes existe diferença apenas nos valores de UFC detectados para $\Delta gtfB$ vs. UA159; além, (*) houve uma diminuição ao passar do tempo 67 a 115 h detectado nas cepas $\Delta gtfB$, $\Delta dltA$ e $\Delta dltD$. Os dados representados são médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e # $p < 0,05$; ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey).

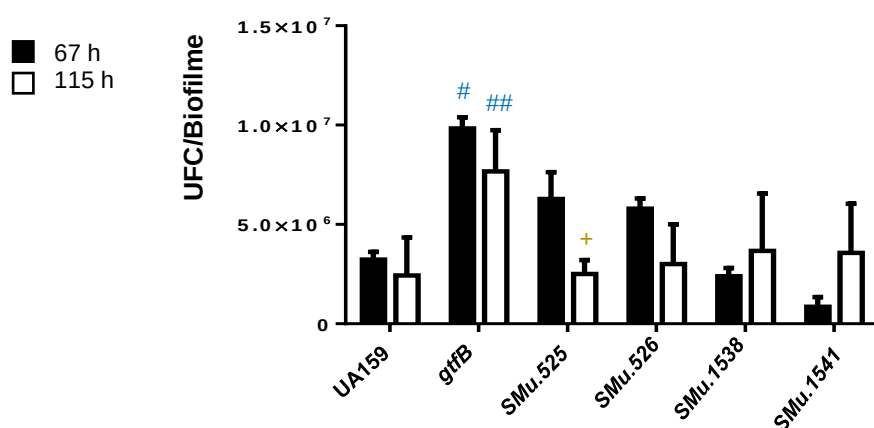
Fonte: Elaboração própria

Para os biofilmes mistos com 115 h de desenvolvimento, observa-se um aumento da espécie *S. mutans* para as 5 cepas mutantes ($\Delta gtfB$, $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.526$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$) nos biofilmes em relação à espécie *S. gordonii*, sendo a maior quantidade de UFC para a cepa $\Delta gtfB$ (* $p < 0,05$). Porém, não houve diferença significativa nos valores de UFC de *S. gordonii* em relação à *S. mutans* parental e para a maioria das cepas testadas ($p > 0,05$) (Figura 16B). Entretanto, não

se detectou a presença de *A. naeslundii* utilizando o método tradicional de cultura. Consequentemente, na idade de 115 h a espécie *S. mutans*, além de ser a espécie cariogênica, é a espécie mais predominante independentemente da modulação realizada via *knockout* de genes específicos.

Embora não haja diferença estatística significativa na quantidade de *S. mutans* em biofilmes mistos na idade 67 h, em biofilmes monoespécies esta espécie é detectada em diferentes quantidades, dependendo do gene que está inativado, sendo que a inativação do gene *gtfB* resulta em maior população nas duas idades (67 e 115 h) (Figura 17). Isso pode ocorrer porque quando da homogeneização da suspensão de biofilmes via sonicação com sonda, uma menor quantidade de MEC no biofilme formado por essa mutante poderia facilitar a quebra de cadeias da morfologia de estreptococos, originando cadeias menores, e consequentemente, aumentando a quantidade de UFC detectadas. Portanto, o gene *gtfB* poderia influenciar na formação de biofilmes cariogênicos e composição dos componentes da matriz, como observado em estudo anterior utilizando esta cepa (Xiao et al.¹²³, 2012).

Figura 17 - Valores de UFC nos biofilmes monoespécie com 67 h e 115 h



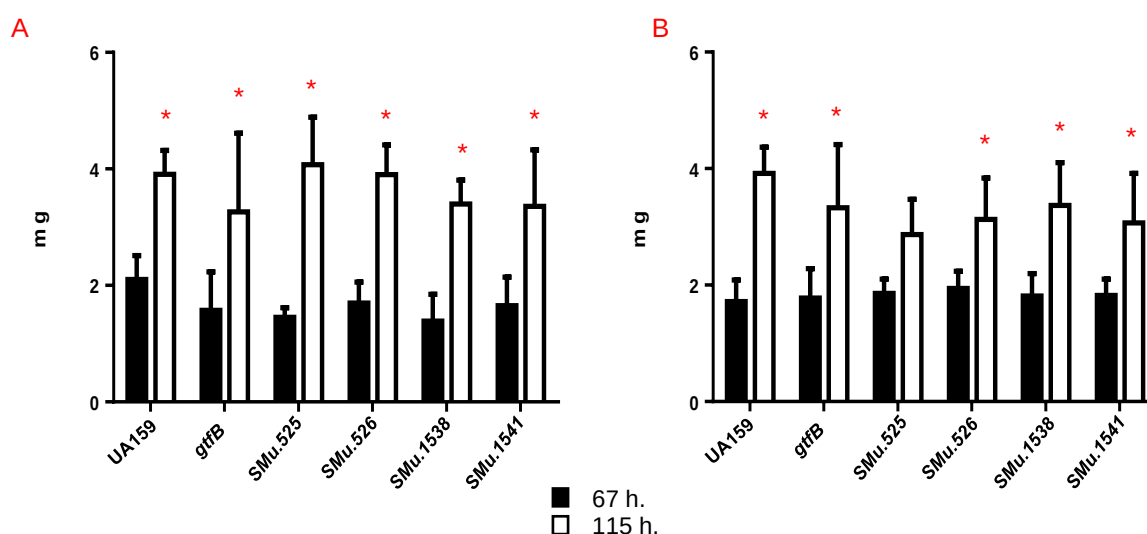
Em biofilmes monoespécie com 67 h (representados com a cor preta): (#) Existe diferença nos valores de UFC detectados para $\Delta gtfB$ vs. toda as cepas *S. mutans* (*p<0,05). Em branco observa-se a idade 115 h: (##) Onde existe diferença de UFC para a cepa $\Delta gtfB$ vs. UA159 e $\Delta SMu.525$; ainda, (+) observa-se uma diminuição de UFC de 67 a 115 h para a cepa $\Delta SMu.525$ (# e +: p<0,05, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria

5.1.3 Peso seco insolúvel - Biomassa nas duas fases de formação

Os dados de biomassa insolúvel, para ambas as idades de biofilmes avaliadas, estão apresentados na Figura 18. Não foram encontradas diferenças na biomassa nos biofilmes monoespécie (Figura 18A) e mistos (Figura 18B) com 67 h, nem com 115 h entre as diferentes cepas de *S. mutans* (vs. cepa parental).

Figura 18 - Biomassa (peso seco) insolúvel em biofilmes monoespécie e mistos



Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67h e 115h. (*) Observa-se um aumento significativo em todas as cepas de 67 a 115 h para os biofilmes monoespécie; o mesmo acontece no biofilme misto, exceto para a cepa Δ SMu.525. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* $p < 0,05$, ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey).

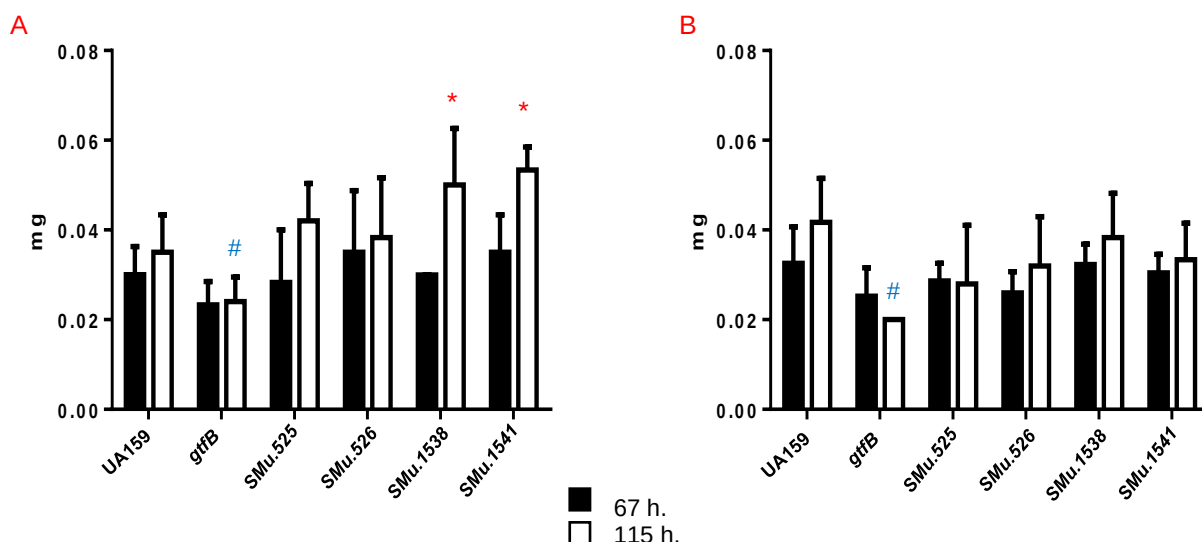
Fonte: Elaboração própria

5.1.4 Proteínas do biofilme em duas fases de formação

O conteúdo proteico na porção insolúvel dos biofilmes monoespécie e mistos com 67 e 115 h de formação não apresentaram diferenças entre as cepas de *S. mutans* parental e mutantes *knockout* avaliadas (Figura 19), exceto para a cepa Δ *gtfB*. Ainda, em biofilmes monoespécie observa-se uma tendência de aumento de proteínas com o tempo, mesmo que não seja estatisticamente significativa ($p > 0,05$ ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey). O biofilme monoespécie formado Δ *gtfB* apresentou menor quantidade de proteínas que os formados pelas cepas Δ SMu.525, Δ SMu.1538 e Δ SMu.1541 na idade 115 h. Ainda, o biofilme misto desenvolvido com

$\Delta gtfB$ apresentou na idade 115 h menor quantidade de proteínas que os biofilmes formados pelas cepas $\Delta SMu.1538$.

Figura 19 - Proteínas na porção insolúvel de biofilmes monoespécie e mistos



Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. Nos biofilmes monoespécie: (#) biofilme formado pela cepa $\Delta gtfB$ apresenta menor quantidade de proteína na idade 115 h (vs. as cepas de *S. mutans* $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$); além, (*) houve um aumento significativo de 67 a 115 h nas cepas $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$. Em biofilmes mistos: (#) a menor quantidade de proteína foi detectada em biofilmes formados por $\Delta gtfB$ na idade 115 h vs. $\Delta SMu.1538$ apenas. Os dados representados são médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey).

Fonte: Elaboração própria

5.2 Análise dos componentes da matriz extracelular de biofilmes monoespécie e mistos

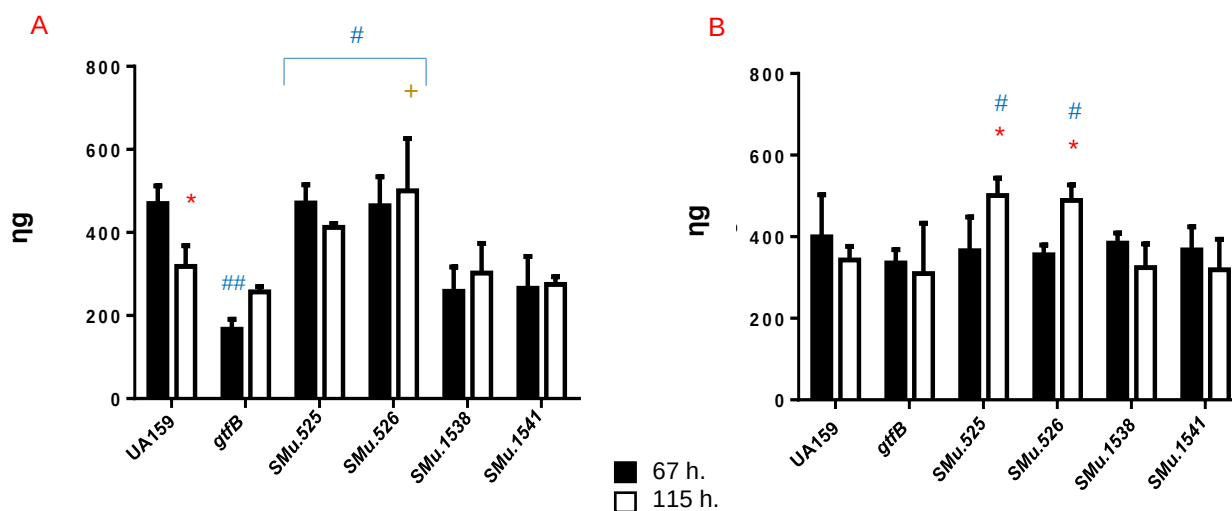
5.2.1 eDNA em duas fases de formação

A quantidade de eDNA recuperada da porção solúvel da MEC de biofilmes com 67 h foi menor para biofilmes $\Delta gtfB$ monoespécie em relação a todos os outros biofilmes testados – monoespécie e mistos (Figura 20). Em biofilmes formados pelas cepas $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$ a quantidade foi maior que em biofilmes monoespécies e mistos formados pelas cepas $\Delta gtfB$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$ nas idades de 67 e 115 h; no entanto, biofilme $\Delta SMu.526$ monoespécie (115 h) apresentou quantidade de eDNA maior à cepa parental em biofilmes monoespécie e mistos.

Nos biofilmes mistos com 67 h observou-se um comportamento similar entre as diferentes cepas de *S. mutans* avaliadas; já na idade de 115 h, houve diferença

significativa de $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$ com as diferentes cepas (Figura 20B). Além disso, há um aumento significativo de eDNA de 67 a 115 h para as cepas dos genes *lytTS* nos biofilmes mistos.

Figura 20 - eDNA na MEC dos biofilmes monespécie e mistos



Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. Para biofilmes monoespécie, (*)houve uma diferença de eDNA entre a cepa parental, sendo 115 h menor que 67 h; (#)as cepas $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$ apresentaram maiores quantidades de eDNA que as cepas $\Delta gtfB$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$ em cada fase testada, (+) $\Delta SMu.526$ (115 h) apresentou maior quantidade vs. a cepa parental (115 h). (*)No biofilme misto houve um aumento entre as idades 67 a 115h nas cepas: $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$. (#)Na idade 115 h, em biofilmes mistos $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$ também apresentaram maior quantidade de eDNA que as demais cepas testadas. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (*, + e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey).

Fonte: Elaboração própria

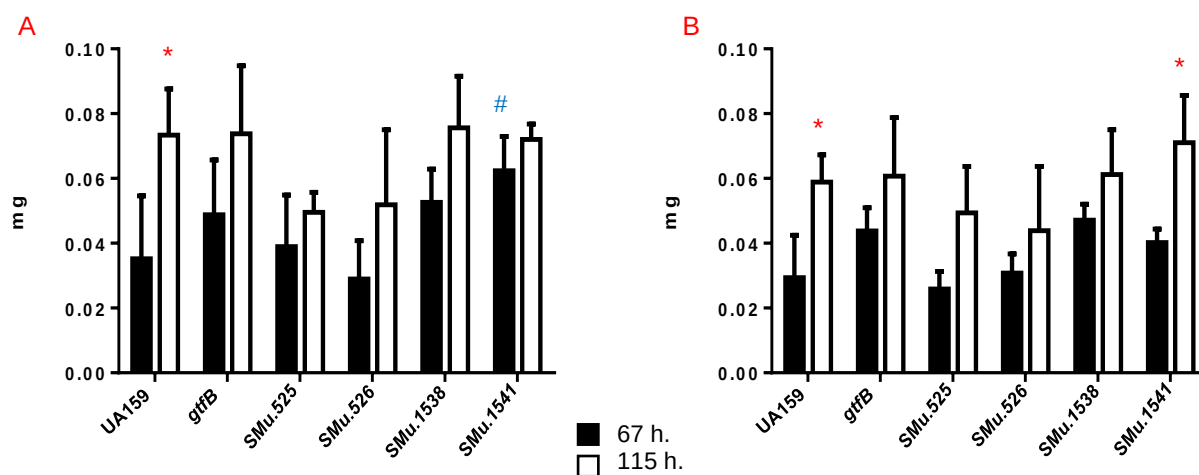
5.2.2 Ácidos lipoteicóicos em duas fases de formação

Para processar, detectar e quantificar o ALT na matriz dos biofilmes cariogênicos, foi necessário a elaborar de uma metodologia efetiva (Item 4.2.4 - Detecção e quantificação de ALT na matriz extracelular). Assim mediante este novo método desenvolvido, detectou-se a presença do ALT na matriz em diferentes quantidades.

Observou-se aumento significativo na quantidade de ALT na MEC de 67 para 115 h em biofilmes monoespécie e mistos formados pela cepa parental (Figura 21A). Ainda, biofilme monoespécie formado pela cepa $\Delta SMu.1541$ têm maiores quantidade de ALT quando são comparadas com a cepa $\Delta SMu.526$ na idade 67 h. Não houve

diferença na idade 115 h dos biofilmes monoespécie. Em biofilmes mistos, houve um aumento progressivo da quantidade de ALT com o tempo para as cepas parental e $\Delta SMu.1541$ (Figura 21B).

Figura 21 - ALT na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos



Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de 67 para 115 h para a cepa parental em ambos biofilmes monoespécie e mistos. (#) Em biofilmes monoespécie as cepas $\Delta SMu.1541$ apresenta quantidades significativamente maiores de ALT do que a cepa $\Delta SMu.526$ na idade 67 h. Em biofilmes mistos não houve diferenças significativas nas duas fases de formação; além, (*) houve um aumento significativo de 67 para 115 h na cepa $\Delta SMu.1541$. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey).

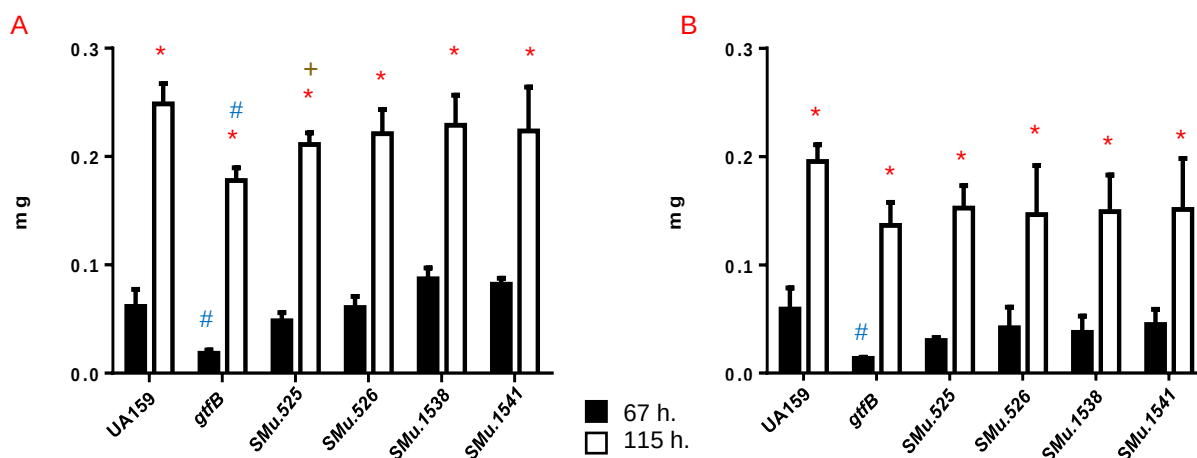
Fonte: Elaboração própria

5.2.3 Exopolissacarídeos solúveis e insolúveis na MEC em duas fases de formação

A quantidade de exopolissacarídeos solúveis (WSP - recuperados da porção solúvel da MEC de biofilmes) e insolúveis (ASP - da porção insolúvel de biofilmes) estão representadas nas Figuras 22 e 23, respetivamente.

Encontrou-se menor quantidade de exopolissacarídeos solúveis em biofilmes monoespécie formados pela cepa $\Delta gtfB$ nas duas fases de formação. O conteúdo de WSP na MEC de biofilmes monoespécie formados pela cepa $\Delta SMu.525$ é menor na idade 115 h, quando foi comparado com a cepa parental. A quantidade de WSP na MEC de biofilmes mistos não variou significativamente entre as diferentes cepas de *S. mutans* nos dois períodos (Figura 22B). Porém, para ambos biofilmes monoespécie e mistos ocorre um aumento significativo de WSP na MEC de 67 para 115 h.

Figura 22 - Exopolissacarídeos solúveis na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos

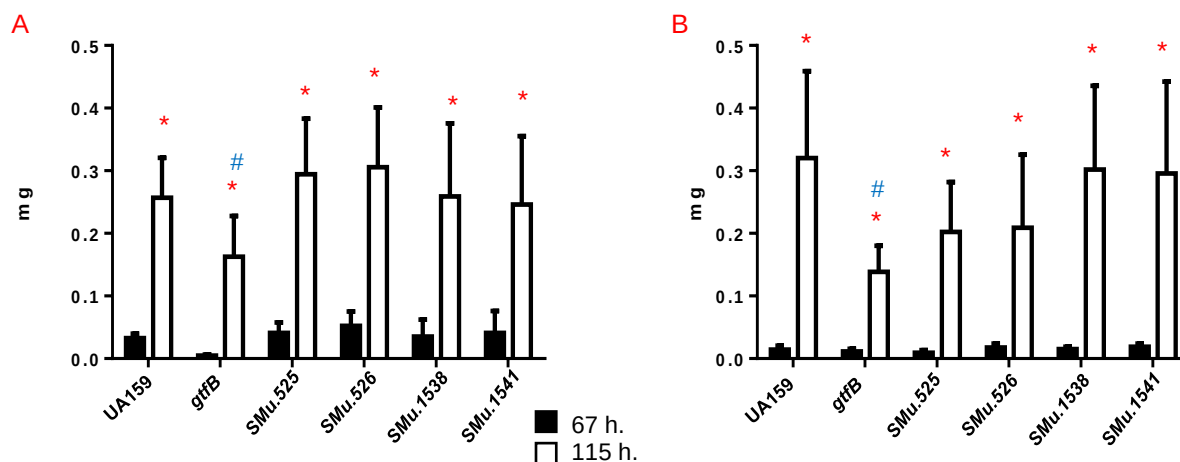


Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de WSP em todas as cepas de biofilmes mistos e monoespécie ao passar de 67 h para 115 h. Biofilmes monoespécies: (#) Nas idades 67 e 115 h, Δ *gtfB* foi a cepa com menor conteúdo de WSP; (+) em 115 h, o biofilme formado por Δ SMu.525 apresentou também, menor quantidade de WSP versus a cepa parental. Em biofilme misto: (#) Δ *gtfB* foi a cepa com menor conteúdo de WSP na idade 67 h. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (*, + e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey).

Fonte: Elaboração própria

Para exopolissacarídeos insolúveis em água houve diferenças significativas na quantidade detectada nas idades 67 e 115 h para todas as cepas de *S. mutans* nos biofilmes monoespécie e mistos (comparação entre todas as cepas). Em biofilmes mistos, na idade de 115 h, detectou-se menor quantidade significativa de ASP em biofilmes formados pela cepa Δ *gtfB* comparada com a cepa parental e as mutantes Δ SMu.1538 e Δ SMu.1541 e as demais cepas tem quantidade similar de ASP versus biofilmes formados pela cepa parental (Figura 23). Essa menor quantidade de ASP em biofilmes formados pela mutante do gene *gtfB* é esperada, pois a enzima codificada por esse gene é uma das responsáveis pela síntese de ASP (Bowen e Koo⁸, 2011; Xiao et al¹²³, 2012). Ainda, como observado para WSP na MEC ocorre um aumento acentuado na quantidade de ASP de 67 para 115 h em biofilmes monoespécie e mistos para todas as cepas de *S. mutans* avaliadas ($p < 0,05$, ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey).

Figura 23 - Exopolissacarídeos insolúveis na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos



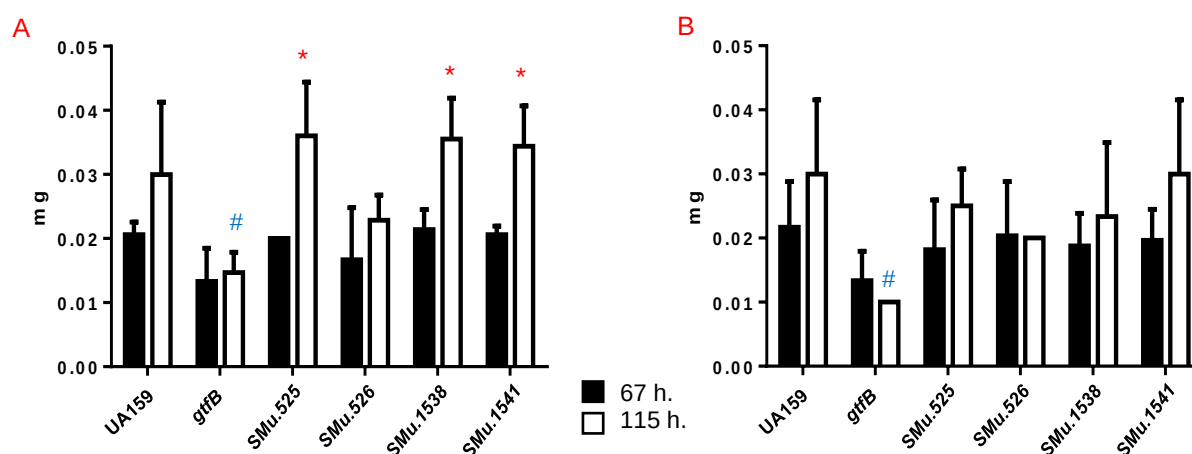
Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de 67 para 115 h nos biofilmes mistos e monoespécie. Em biofilme monoespécie: (#) Na idade 115 h, $\Delta gtfB$ foi a cepa com menor quantidade de ASP versus $\Delta SMu.526$. Em biofilme misto: (#) Na idade 115 h, $\Delta gtfB$ foi a cepa com menor quantidade de ASP versus as cepas parental UA159, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey).

Fonte: Elaboração própria

5.2.4 Proteínas solúveis em duas fases de formação

O total de proteínas foi maior quando os biofilmes monoespécie atingiram a idade de 115 h, observando-se valores maiores para os biofilmes formados pelas cepas parental, $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.1538$. A quantidade de proteínas solúveis na MEC de biofilmes mistos e monoespécie na idade de 67 h não apresentou diferenças significativas entre as cepas testadas. Na idade 115 h, biofilme monoespécie de $\Delta gtfB$ apresentou a menor quantidade de proteína na MEC em relação as demais cepas de *S. mutans*. Já em biofilme misto, na idade de 115 h, houve diferença significativa apenas para $\Delta gtfB$ (vs. cepas parental UA159 e $\Delta SMu.1541$), que apresentou menor quantidade de proteína solúvel na MEC (Figura 24B).

Figura 24 - Proteínas solúveis na MEC recuperadas de biofilmes monoespécie e mistos



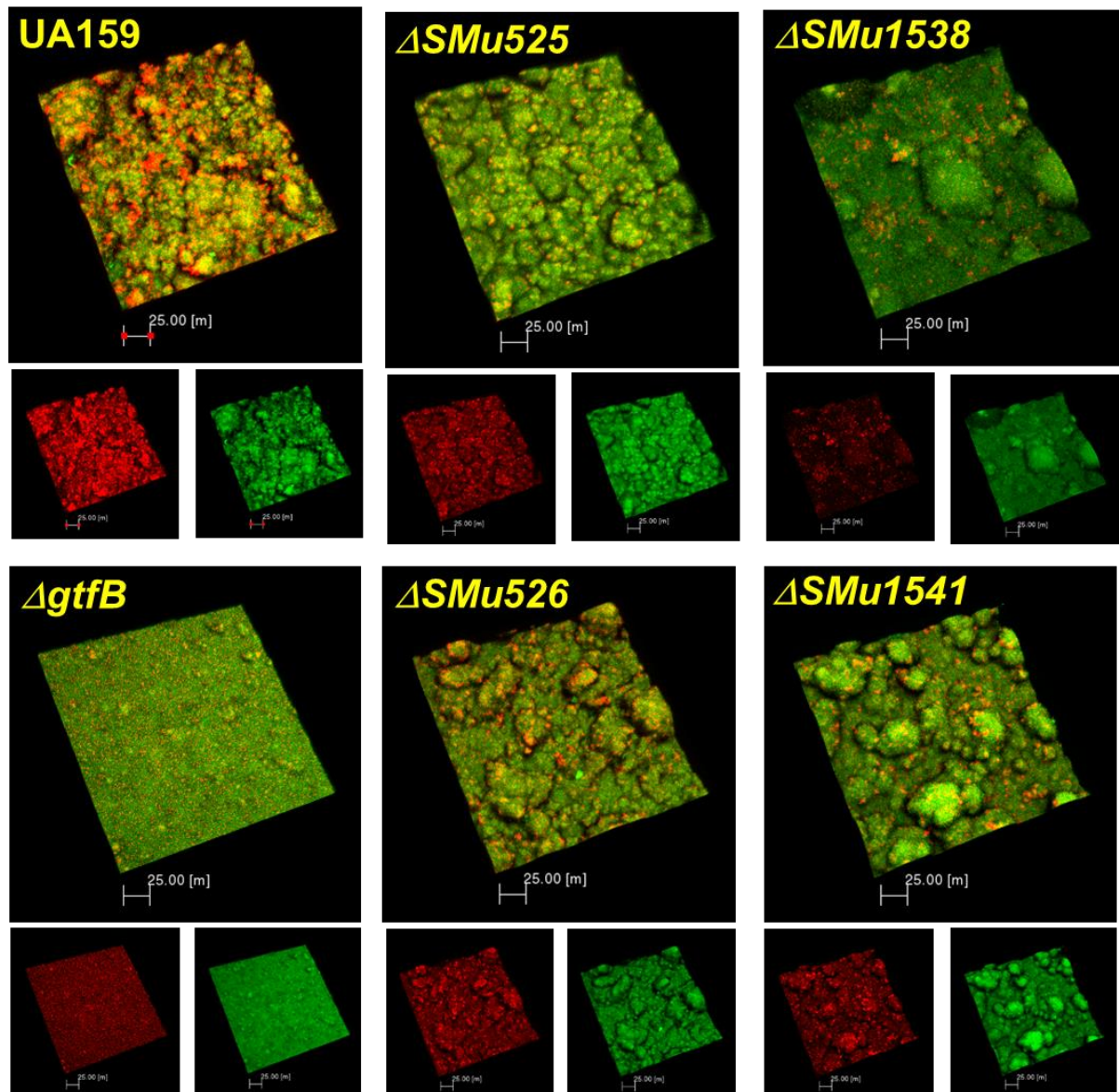
Biofilmes monoespécie (A) e biofilmes mistos (B) com idades de 67 h e 115 h. (*) Houve um aumento significativo de 67 para 115 h para as cepas $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$ em biofilmes monoespécie. (#) Na idade de 115 h de biofilmes monoespécie, houve uma diminuição de proteínas para $\Delta gtfB$ vs. todas as cepas exceto $\Delta SMu.526$. (#) Na idade 115 h de biofilmes mistos, $\Delta gtfB$ apresentou a menor quantidade de proteínas na MEC vs. todos os outros biofilmes com a mesma idade. Os dados representados são médias, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão (* e #: $p < 0,05$, ANOVA dois critérios, seguido do teste de Tukey).

Fonte: Elaboração própria

5.3 Estrutura 3D dos biofilmes

A organização estrutural 3D foi avaliada em biofilmes monoespécie na idade 115 h e as imagens representativas estão apresentadas na Figura 25. Tal como esperado, o biofilme formado pela cepa parental UA159 apresenta microcolônias bem definidas envolvidas com matriz de ESP, enquanto biofilme formado pela cepa $\Delta gtfB$ carece de microcolônias definidas (Koo et al.⁵⁹, 2010; Xiao et al.¹²³, 2012). Isto ocorre porque a cepa mutante $\Delta gtfB$ não possui a enzima GtfB funcionando para a produção de ASP em superfícies bacterianas; embora enzima GtfC esteja ativa, a mesma tem afinidade para a superfície de SHA, e forma um tapete de matriz de EPS nela (Koo et al.⁵⁹, 2010; Xiao et al.¹²³, 2012), como observado na Figura 25. A estrutura 3D dos biofilmes formados por $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.526$ e $\Delta SMu.1541$ são semelhantes e apresentam microcolônias maiores e mais definidas em comparação com cepa parental UA159. No entanto, os biofilmes formados pela cepa $\Delta SMu.1538$ apresentam microcolônias maiores e demarcadas, bem como áreas sem microcolônias.

Figura 25 - Arquitetura 3D de biofilmes monoespécie



Esta figura exibe imagens representativas de renderizações 3D dos biofilmes monoespécie formados por *S. mutans* cepa parental (UA159) e mutantes ($\Delta gtfB$, $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu526$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$) com idade de 115 h. A cor verde representa o conteúdo bacteriano em cada biofilme, enquanto que a cor vermelha representa ESP na matriz extracelular.

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

O entendimento de todos os eventos biológicos que ocorrem na construção do biofilme é pertinente, especialmente os que acontecem no desenvolvimento da MEC. Deste modo, pode se desenvolver abordagens eficazes para prevenir e tratar biofilmes patogênicos. Assim, o presente estudo avaliou a composição bioquímica da MEC, detectando a presença e conteúdo de eDNA, ALT, exopolissacarídeos solúveis e insolúveis, e proteínas solúveis. Em geral, os componentes foram mais abundantes na idade de 115 horas, e existe uma quantidade relativamente maior deles em biofilmes monoespécie, quando comparado com biofilmes mistos. Este fenômeno pode ocorrer devido à presença de outras espécies no biofilme de espécies mistas, que podem interferir ou estimular os componentes específicos na MEC. Além disso, a eliminação de genes específicos afeta a MEC não só na composição, mas também na dinâmica de populações e arquitetura 3D de biofilmes cariogênicos.

6.1 Análise de biofilmes monoespécie e mistos

6.1.1 pH de meios de cultura de biofilmes monoespécie e mistos

Os meios de culturas de todos os biofilmes testados têm o pH mais baixo na presença dos dois carboidratos (pH crítico para desmineralização do esmalte dentário), o que pode tornar o biofilme em estudo ainda mais cariogênico, e pode resultar em biofilmes mais robustos, coesivos e aderentes à superfície dentária. Embora os comportamentos dos biofilmes tenham sido relativamente parecidos para todas as cepas testadas, os valores de pH em biofilmes monoespécie foram em média menores do que em biofilmes mistos nas idades 19, 29, 43, 53, 67, 77 e 101 h. Um menor pH em biofilmes monoespécie pode ser justificado pela ausência de competição por nutrientes e por metabólitos entre as cepas como ocorre nos biofilmes mistos.

O conceito de pH crítico foi introduzido por Stephan¹¹⁰ (1940), e revisado recentemente por Bowen⁹ (2013). Isto aconteceu porque o meio de cultura continha mais carboidratos (0,5% de sacarose + 1% de amido) para serem metabolizados em ácido (e também exopolissacarídeos) no período anterior à verificação do pH, o que era desejado pelo desenho experimental utilizado (*i.e.*, desafio cariogênico), ratificando assim que o biofilme na presença de alta concentração de sacarose e

amido claramente aumenta a sua acidez. Na dieta moderna, a sacarose e o amido são ingeridos simultaneamente ou intercalados, e tem sido sugerido que o amido pode aumentar o poder cariogênico da sacarose (Duarte et al.²⁴, 2008; Klein et al.^{52, 53}, 2009, 2010; Ribeiro et al.⁹⁶, 2005).

6.1.2 População microbiana dos biofilmes

A relação entre a abundância de carboidratos sacarose e amido e o tempo poderia ajudar a aumentar a aderência de microrganismos à superfície de hidroxiapatita e a matriz, formando assim biofilmes mais maduros, que podem ser evidenciados em 115 h (Kuramitsu et al.⁶⁴, 1980; Rolla et al.⁹⁸, 1980). *S. mutans* e *S. gordonii* estão presentes durante todo o processo de crescimento até atingirem a idade de 115 h, enquanto *A. naeslundii* acompanhou este processo, mas na fase final não foi observado via método de cultivo. *S. mutans* é a espécie cariogênica que aumenta sua população conforme o tempo passa, sob condições adequadas, mas nem sempre é o organismo mais abundante na comunidade colonizadora inicial na superfície do dente (Takahashi, Nyvad¹¹³ 2011, Tanzer et al.¹¹⁶, 2012, Mattos Graner et al.⁷⁶, 2014). Assim, condições favoráveis, como abundância de carboidratos fermentáveis (para produção de ácido) e que funcionam como substrato (sacarose) e aceptores (hidrolizados de amido) para enzimas que sintetizam WSP e ASP, podem promover o crescimento da espécie *S. mutans* (Bowen, Koo⁸, 2011). A competição entre os produtores de álcali (*S. gordonii* e *A. naeslundii* utilizados aqui) e *S. mutans* parece ser mascarada no desenho experimental utilizado, pois *S. mutans* se torna a espécie majoritária em biofilmes maduros.

No modelo in vitro utilizado no presente estudo, observa-se que mesmo tendo a presença de saliva no meio de cultura, o desafio cariogênico utilizando a combinação de sacarose e amido favoreceu o desenvolvimento da população de *S. mutans* na presença de *S. gordonii* e *A. naeslundii*. As espécies *S. gordonii* e *A. naeslundii* são capazes de produzir amônia utilizando substratos salivares como a arginina (*S. gordonii*) via sistema de desaminação de arginina (ADS) e uréia (*A. naeslundii*) via enzima urease (Liu et al.⁶⁹, 2012; Nascimento et al.⁸¹, 2013). Presumivelmente, as bactérias produtoras de álcali protegeriam contra a acidificação do biofilme e impediriam o crescimento ou a dominância de microrganismos cariogênicos que prosperam em condições ácidas, e ao mesmo tempo ajudariam a prevenir os efeitos

deletérios da desmineralização. Nota-se que a expressão e atividade de ADS e urease é aumentada em resposta à níveis elevados de arginina e uréia, valores de pH baixos (*i.e.*, ácidos, como os encontrados nos meios de cultura – Figura 13) e em interações entre espécies (como observado entre *S. gordonii* e *A. naelundii*) (Jakubovics et al.⁴⁷, 2008; Liu et al.⁶⁹, 2012). Esses mecanismos podem fornecer às bactérias produtoras de álcali uma vantagem competitiva quando o ambiente do biofilme se torna acidificado, potencialmente resultando em diminuição do risco de cárie. Nesse sentido, o aumento do metabolismo de arginina associado ao uso de dentifrício contendo arginina pode exercer um efeito inibitório de cárie clinicamente (Nascimento et al.⁸¹, 2014). Porém, as espécies que possuem ADS e urease também são acidogênicas e acidúricas. Se o uso de arginina e de uréia é apenas para neutralizar o ambiente ácido em biofilmes ou se esses sistemas são ativados para competir contra outras espécies acidúricas e afetar a construção da MEC, isso ainda precisa ser bem elucidado. Um estudo recente utilizou aplicação tópica de arginina e verificou que a presença elevada da mesma influenciou negativamente na quantidade de EPS na matriz de biofilmes mistos (He et al.⁴², 2016), contendo os microrganismos utilizados no presente estudo. Portanto, o entendimento desta dinâmica populacional é importante para a aplicação de estratégias de controle de biofilme patogênico (*i.e.*, inativação de espécies específicas ou de vias metabólicas dessas espécies).

6.1.3 Peso seco insolúvel - Biomassa nas duas fases de formação

Ocorre um aumento progressivo na biomassa de todos os biofilmes de 67 para 115 h, e este aumento pode estar relacionado com o aumento de componentes específicos na MEC. Assim, a avaliação dos componentes da MEC pode revelar quais componentes contribuem para essa elevação na biomassa.

6.1.4 Proteínas do biofilme em duas fases de formação

As proteínas na porção insolúvel dos biofilmes não variaram muito nos biofilmes monoespécie e mistos com o tempo, exceto em biofilmes formados pelas cepas $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$. Esses dados foram inesperados, pois esperava-se que um aumento desse componente ocorreria com o desenvolvimento dos biofilmes, e isso fosse correlacionado positivamente com o aumento na população bacteriana, o que não ocorreu.

6.2 Análise dos componentes da matriz extracelular de biofilmes monoespécie e mistos

6.2.1 eDNA em duas fases de formação

Houve maior similaridade na quantidade de eDNA nos biofilmes mistos comparados aos monoespécie. Isso pode ser porque as outras espécies (*S. gordonii* e *A. naelundii*) também contribuem para a presença de eDNA na MEC, embora *S. mutans* possa ser o principal contribuinte por ser a espécie majoritária nessa população.

As cepas mutantes $\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$ geralmente apresentaram as maiores quantidades de eDNA comparadas à todas as cepas testadas em biofilmes monoespécie e mistos. Porém, esses dados não eram esperados, pois a expectativa era de que a ausência dos genes *lytTS* ocasionasse um decréscimo de eDNA na MEC, quando comparado à cepa parental. Assim, o mecanismo exato de como os genes *lytTS* tem participação na modulação de eDNA na matriz extracelular ainda precisa ser desvendado. Portanto, pode ser postulado que a discrepância observada quando o sistema *lytTS* não está intacto pode ser devido (1) ao aumento na remodelagem da parede celular, o que aumentaria a secreção de microvisículas contendo eDNA ou, (2) ativação de vias metabólicas alternativas que culminam com uma liberação aumentada de eDNA na matriz. Assim, os genes *lytTS* ($\Delta SMu.525$ e $\Delta SMu.526$) poderiam ajudar a formação de uma matriz altamente coesiva que elevaria a produção de eDNA e exopolissacarídeos. Ainda, eDNA confere carga negativa à MEC, e as quantidades detectadas poderiam influenciar a ação de agentes preventivos ou terapêuticos catiônicos (e.g., ação limitada de clorexidina, Xiao et al¹²³, 2012).

6.2.2 Ácidos lipoteicóicos em duas fases de formação

A presença de ALT na MEC de biofilmes cariogênicos poderia contribuir para o desenvolvimento da matriz, mas o mecanismo exato não é conhecido. A maior quantidade de ALT para as cepas $\Delta SMu.1538$ (mesmo não sendo estatisticamente significativa) e $\Delta SMu.1541$ foi um dado inesperado, assim a ausência dos genes operon *dltABCD* pode ser compensada de alguma maneira desconhecida, ocasionando aumento com o tempo de ALT na MEC dos biofilmes formados por estas cepas. Portanto, pode se postular que existe um aumento na remodelagem da parede celular, que poderia estar relacionado ao aumento de UFC nos biofilmes formados por

pelas cepas $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$, o que torna esses genes relevantes como alvos para futuras terapias, como sugerido previamente (Qiu et al.⁹³, 2015). Ainda, o processo de adição de resíduos de D-alanina mediado pelo operon *dltABCD* (Neuhaus, Baddiley⁸², 2003) durante a formação de ALT pode conferir resistência a antimicrobianos catiônicos em *Streptococcus pneumoniae* (Kovács et al.⁶⁰, 2006), mas como esse processo afetaria estratégias contra biofilmes cariogênicos ainda necessita ser estudado.

6.2.3 Exopolissacarídeos solúveis e insolúveis na MEC em duas fases de formação

Com o amadurecimento dos biofilmes, ocorre um aumento significativo de ASP e WSP na MEC dos biofilmes monoespécie e mistos formados por todas as cepas. Esse aumento na quantidade de EPS insolúvel e solúvel pode estar diretamente relacionado com o aumento na biomassa total para todas as cepas de *S. mutans* em biofilmes monoespécie e mistos; exceto para o conteúdo de ASP da cepa $\Delta gtfB$ em biofilme monoespécie (correlação de Person correlation – APÊNDICE A) e $\Delta SMu.525$ em biofilme misto (correlação de Person correlation - APÊNDICE B). Ainda, uma tendência similar de aumento de EPS solúvel com aumento de biomassa foi observada para todas as cepas e tipos de biofilmes (correlação de Person correlation - APÊNDICE C e D), exceto para o conteúdo de WSP da cepa $\Delta SMu.526$ em biofilme misto (correlação de Person correlation - APÊNDICE D).

6.2.4 Proteínas solúveis em duas fases de formação

O conteúdo de proteínas solúveis na MEC de biofilmes monoespécie aumentou com o envelhecimento para a cepa parental e as cepas $\Delta SMu.525$, $\Delta SMu.1538$ e $\Delta SMu.1541$. Porém, os biofilmes mistos não apresentaram diferenças acentuadas na quantidade de proteínas solúveis na MEC com o passar do tempo. Na literatura não há relatos sobre esse componente da MEC em biofilmes cariogênicos e não houve associação com os outros componentes da MEC.

6.3 Estrutura 3D dos biofilmes

A inativação do gene *SMu.1538* teve maior influência sobre a organização 3D de *S. mutans* em biofilmes cariogênicos, comparados as cepas parental e outras

mutantes (exceto *ΔgtfB*). A forma de microcolônias bacterianas e a distribuição de EPS podem influenciar na difusão dos metabólitos e na ação de agentes antimicrobianos sobre os microrganismos. Em estudos anteriores, foi demonstrado que dentro das microcolônias maiores, nichos ácidos são criados (Xiao et al.¹²³, 2012), promovendo a desmineralização dentária. Assim, estudos futuros devem demonstrar como os genes específicos testados aqui podem influenciar terapias antibiofilme e direcionar melhor opção de tratamento.

Em biofilmes mistos, é evidente a presença de todos os componentes da MEC, porém as três espécies utilizadas poderiam estar produzindo eDNA, ALT e ESP (Neuhaus, Baddiley⁸² 2003, Klein et al.⁵², 2009), mas o impacto exato de cada espécie durante a construção da MEC é desconhecido, embora *S. mutans* aparente ser o principal patógeno sob condições cariogênicas (Rölla et al.⁹⁹, 1983). Na fase transição (67 h) e maturação (115 h) na presença dos carboidratos, eDNA e ALT são liberados na MEC, mas as quantidades foram mais elevadas na idade de 115 h.

A libertação de eDNA pode ser devido à indução da expressão de genes *lytTS* (Klein et al.⁵³, 2010). Assim, a inativação desses genes nas *ΔSMu.525* e *ΔSMu.526* deveria afetar negativamente a detecção de eDNA na MEC. Portanto, a detecção de quantidades elevadas de eDNA em ambos biofilmes de 67 e 115 h, monoespécie e mistos, foi inesperada e, logo, outros fatores podem estar influenciando a presença e a quantidade de eDNA na matriz. A falta de gene *lytTS*, representada pela cepa *ΔSMu.525*, influenciou o aumento do conteúdo de WSP, de 67 para 115 h em biofilmes monoespécie, tornando a cepa *ΔSMu.525* mais relevantes para futuras pesquisas.

Os genes do sistema operon *dltABCD* estão associados ao metabolismo de ALT (Neuhaus, Baddiley⁸², 2003). Em adição, os genes *dltA* e *dltD*, representados pelas cepas *ΔSMu.1538* e *ΔSMu.1541*, influenciaram a produção de todos os componentes da MEC e do biofilme, observando-se aumento de ALT em biofilmes monoespécie (67 h).

Portanto, estratégias preventivas e/ou intervenções terapêuticas que afetem o desenvolvimento dos biofilmes, especificamente os componentes da MEC, poderiam minimizar a patogenicidade dos mesmos.

7 CONCLUSÃO

As altas concentrações de carboidratos (sacarose e amido) e o tempo influenciam o desenvolvimento populacional e outros componentes, bem como a acidez do biofilme, favorecendo a cariogenecidade e maturação do mesmo. Isso é evidenciado pela presença e aumento de todos os componentes dos biofilmes avaliados, assim proporcionalmente se demonstra aumento na biomassa desses biofilmes. Portanto, as conclusões específicas desta pesquisa são:

- A ausência dos genes *gtfB*, *lytT*, *lytS*, *dltA* e *dltD* não influenciou na dinâmica de crescimento populacional das cepas de *S. mutans* em biofilme monoespécie ou misto, embora a arquitetura do biofilme das cepas *knockout* seja nitidamente diferente da cepa parental (UA159).
- A ausência do gene *gtfB* reduziu a produção total de proteínas e de EPS solúveis e insolúveis em biofilme monoespécie e biofilme misto.
- A ausência dos genes *lytT* e *lytS* induziram maior liberação de eDNA. O mesmo ocorreu para os genes *dltA* e *dltD* quanto a presença de ALT.
- *S. mutans* possivelmente apresenta outros sistemas que são ativados para compensar a ausência de atividades dos sistemas *lytTS* e *dltABCD* que também mantém as propriedades estruturais e funcionais da MEC do biofilme.

REFERÊNCIAS*

1. 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.
2. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*. 2006; 59(4): 1114-28.
3. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(2): 89-99.
4. Banas JÁ. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*. 2004; 9(1): 1267-77.
5. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3): 1001–9.
6. Bergeron LJ, Morou-Bermudez E, Burne RA. Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *J Bacteriol*. 2000; 182(13): 3649-54.
7. 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.
8. 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.
9. Bowen WH. The Stephan curve revisited. *Odontology*. 2013; 101(1): 2-8.
10. Bowen W.H. Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol*. 2015; 31(3): 228-33.
11. Burt BA, Loesche WJ, Eklund SA. Stability of selected plaque species and their relationship to caries in a child population over 2 years. *Caries Res*. 1985; 19(13): 193–200.
12. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005; 13(1): 20-6.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. 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.
14. Chatfield CH, Koo H, Quivey RG Jr. The putative autolysin regulator LytR in *Streptococcus mutans* plays a role in cell division and is growth-phase regulated. *Microbiology*. 2005; 151(2): 625-31.
15. Chiu TH, Baker JJ. Lipoteichoic acid from *Streptococcus sanguis* is a natural glucosyl acceptor for glucosyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 202(3): 1407-12.
16. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al.. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013; 28(2): 83–101.
17. Ciardi JE, Rølla G, Bowen WH, Reilly JA. Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. *Scand J Dent Res*. 1977; 85(6): 387-91.
18. Ciardi JE, Reilly JA, Haller RH, Bowen WH, Rølla G. The role of lipoteichoic acid in the adherence and colonization of oral streptococci. New York, N.Y: Academic Press; 1981.
19. Costa SM, Adelário AK, Vasconcelos M, Abreu MHNG. Modelos explicativos da cárie dentária: do organicista ao ecossistêmico. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2012; 12(2): 285-91.
20. Cross SE, Kreth J, Zhu L, Sullivan R, Shi W, Qi F, et al. Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. *Microbiology*. 2007; 153(9): 3124-32.
21. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(10): 3405-8.
22. De Carvalho F, Silva D, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. In dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(11): 1024-8.
23. Denapaite D, Brückner R, Hakenbeck R, Vollmer W. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microb Drug Resist*. 2012; 18(13): 344-58.
24. Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 206-12.
25. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956; 28(3): 350–6.

26. Ellwood DC, Tempest DW. Effects of environment on bacterial wall content and composition. *Adv Microb Physiol.* 1972; 7: 83–116.
27. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014; 82(5): 1968-81.
28. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004; 38(3): 182- 91.
29. Firestone AR, Shmid R, Muhlemann HR. Cariogenic effects of cooked wheat starch alone or with sucrose and frequency-controlled feedings in rats. *Arch Oral Biol.* 1982; 27(9): 759-63.
30. Filtzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61(1): 9-19.
31. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33.
32. Fu DT, Robyt JF. Maltodextrin acceptor reactions of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydr Res.* 1991; 217: 201-11.
33. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002; 43(6): 1367–78.
34. 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.
35. 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.
36. 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: 3423–6.
37. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2013; 41(2): 107-18.
38. Haisman RJ, Jenkinson HF. Mutants of *Streptococcus gordonii* Challis over-producing glucosyltransferase. *J Gen Microbiol.* 1991; 137(3): 483-9.
39. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2015; dec 30. [Epub ahead of print].

40. Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, et al. Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(11): 1003-10.
41. Hardy L, Jacques NA, Forester H, Campbell LK, Knox KW, Wicken AJ. Effect of fructose and other carbohydrates on the surface properties, lipoteichoic acid production, and extracellular proteins of *Streptococcus mutans* Ingbritt grown in continuous culture. *Infect Immun.* 1981; 31(1): 78-87.
42. He J, Hwang G, Liu Y, Gao L, Kilpatrick-Liverman L, Santarpia P, et al. L-arginine modifies the exopolysaccharides matrix and thwarts *Streptococcus mutans* outgrowth within mixed-species oral biofilms. *J Bacteriol.* 2016; 198(19): 2651-61.
43. Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47(1): 62-6.
44. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(5): 1461-8.
45. Hwang G, Klein MI, Koo H. Analysis of the mechanical stability and surface detachment of mature *Streptococcus mutans* biofilms by applying a range of external shear forces. *Biofouling.* 2014; 30(9): 1079-91.
46. Jacques NA, Hardy L, Campbell LK, Knox KW, Evans JD, Wicken AJ. Effect of carbohydrate source and growth conditions on the production of lipoteichoic acid by *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun.* 1979; 26(3): 1079-87.
47. Jakubovics NS, Gill SR, Iobst SE, Vickerman MM, Kolenbrander PE. Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *J Bacteriol.* 2008; 190(10): 3646-57.
48. Jakubovics NS, Palmer RJ. *Oral microbial ecology.* Norfolk: Caister Academic Press; 2013.
49. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Bio.* 2009; 73(2): 310-47.
50. 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.
51. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol.* 1960; 1: 304-20.

52. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilms development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(3): 837-41.
53. 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.
54. Klein MI, Xiao J, Heydorn A, Koo H. An analytical tool-box for comprehensive biochemical, structural and transcriptome evaluation of oral biofilms mediated by *mutans Streptococci*. *J Vis Exp.* 2011; 25(47): e2512.
55. Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates III JR, Koo H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45795.
56. Klein MI, Falsetta ML, Xiao J, Bowen WH, Koo H. The role of extracellular polysaccharides in virulent cariogenic oral biofilms. In: Jakubovics N, Palmer R, eds. *Oral microbial ecology*. Norfolk: Caister Academic Press; 2013.
57. 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.
58. Kneist S, Kubieziel H, Willershausen B, Küpper H, Callaway A. Modeling of *S mutans* and *A naeslundii* acid production in vitro with caries incidence of low- and high-risk children. *Quintessence Int.* 2012; 43(5): 413-20.
59. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192(12): 3024-32.
60. Kovács M, Halfmann A, Fedtke I, Heintz M, Peschel A, Vollmer W, et al. A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2006; 188(16): 5797-805.
61. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008; 190(13): 4632-40.
62. Kreth J, Vu H, Zhang Y, Herzberg MC. Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol.* 2009; 191(20): 6281-91.
63. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000.* 2010; 52(1): 38–52.

64. Kuramitsu HK, Wondrack L, McGuinness M. Interaction of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases with teichoic acids. *Infect Immun*. 1980; 29(2): 376-82.
65. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *Int J Dent*. 2011; 2011: e953412.
66. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2008; 154(11): 3247–55.
67. Li Y, Burne RA. Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology*. 2001;147(10): 2841-8.
68. 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.
69. Liu YL, Nascimento M, Burne RA. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries *Int J Oral Sci*. 2012; 4(3): 135-40.
70. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; 50(4): 353–80.
71. Manji F, Fejerskov O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. *J Dent Res*. 1990; 69: 733-41.
72. 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.
73. 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.
74. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 263-71.
75. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149(2): 279-94.
76. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons learned from clinical studies: roles of *mutans streptococci* in the pathogenesis of dental caries. *Curr. Oral Health Rep*. 2014; 1(1): 70–8.
77. Melsen B, Kaae O, Rølla G, Fejerskov O, Karring T. Penetration of ions in human dental plaque. *Arch Oral Biol*. 1979; 24(1): 75-81.

78. Melvaer KL, Helgeland K, Rølla G. Some physical and chemical properties of 'soluble' and 'insoluble' polysaccharides produced by strains of *Streptococcus mutans* and *sanguis*. Caries Res. 1972; 6(1): 79.
79. Melvaer KL, Helgeland K, Rølla G. A charged component in purified polysaccharide preparations from *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Arch Oral Biol. 1974; 19(7): 589-95.
80. Miller CH. Degradation of Sucrose by Whole Cells and Plaque of *Actinomyces naeslundii*. Infect immun. 1974; 10(6): 1280-91.
81. Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, et al. Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. J Dent Res. 2013; 92(7): 604-8.
82. 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.
83. Newbrun E. Cariology. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1983.
84. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev. 2009; 73(3): 407-50.
85. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. Ann N Y Acad Sci 2007; 1098: 22-50.
86. Paes 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.
87. Palmer SR, Miller JH, Abranches J, Zeng L, Lefebure T, Richards VP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomically-diverse isolates of *Streptococcus mutans*. PLoS One. 2013; 8(4): e61358.
88. Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. Oral Health Prev Dent. 2010; 8(1): 59-70.
89. Parisotto TM, Stipp R, Rodrigues LK, Mattos-Graner RO, Costa LS, Nobre-Dos-Santos M. Can insoluble polysaccharide concentration in dental plaque, sugar exposure and cariogenic microorganisms predict early childhood caries? A follow-up study. Arch Oral Biol. 2015; 60(8): 1091-7.
90. 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.
91. 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.

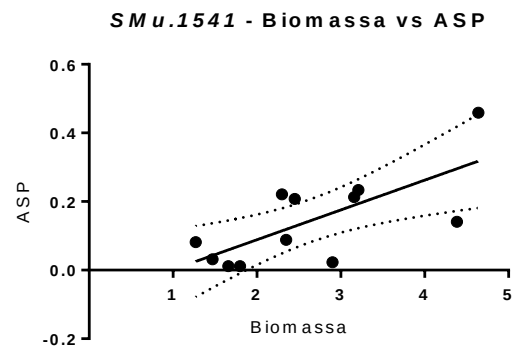
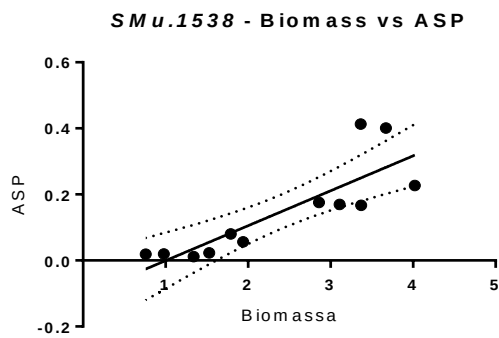
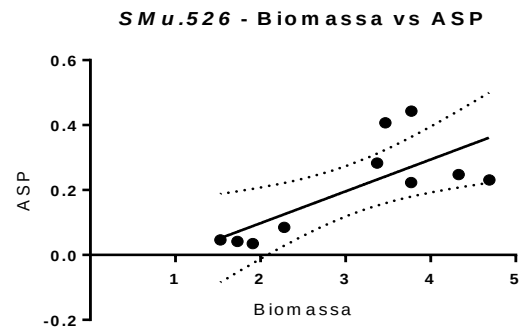
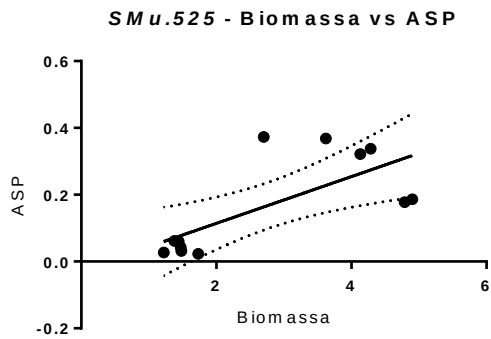
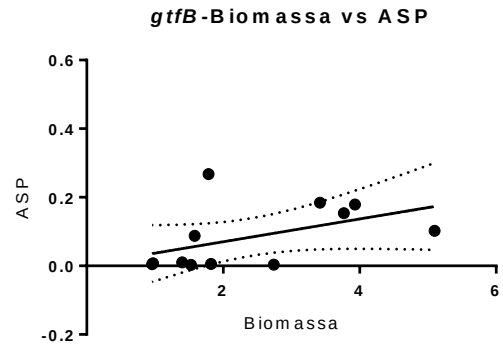
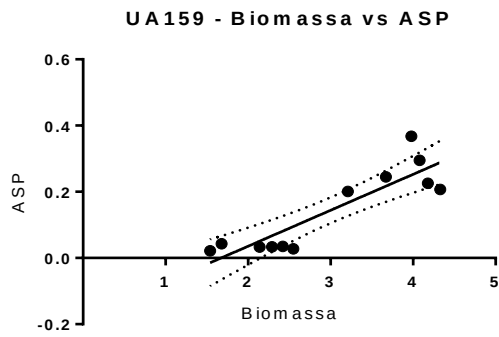
92. Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(9): 3515-9.
93. Qiu W, Zheng X, Wei Y, Zhou X, Zhang K, Wang S, et al. D-Alanine metabolism is essential for growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol.* 2015; 31(5): 435-44.
94. Quivey RG, Grayhack EJ, Faustoferri RC, Hubbard CJ, Baldeck JD, Wolf AS, et al. Functional profiling in *Streptococcus mutans*: construction and examination of a genomic collection of gene deletion mutants. *Mol Oral Microbiol.* 2015; 30(6): 474-95.
95. Reichmann NT, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum *Firmicutes*. *FEMS Microbiol Lett.* 2011; 319(2): 97-105.
96. 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.
97. Rogers JD, Palmer RJ, Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun.* 2001; 69(11): 7046-56.
98. Rølla 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.
99. Rølla G, Ciardi JE, Bowen WH. Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res.* 1983; 91(3): 186-90.
100. Sampaio-Maia B, Monteiro-Silva F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: an update. *Dent Res J.* 2014; 11(3): 291-301.
101. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; 74(7): 1360–6.
102. Schachtele CF, Nobbs A, Zhang Y, Costalonga M, Herzberg MC. Oral streptococci: commensals and opportunistic pathogens. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2007.
103. Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol.* 2009; 191(13): 44097-102.
104. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB, Dental caries. *Lancet.* 2007; 369(9555): 51-9.

105. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res.* 2007; 6(6): 2152-60.
106. Smith EG, Spatafora GA. Generegulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J Dent Res.* 2012; 91(2): 133–41.
107. Socransky SS, Hubersak C, Propas D. Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. *Arch Oral Biol.* 1970; 15(10): 993-5.
108. 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.
109. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(9): 5404-10.
110. Stephan RM. Changes in hydrogen-ion concentrations on tooth surfaces and in carious lesions. *J Am Dent Assoc.* 1940; 27: 718–23.
111. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(3): 199-210.
112. Sutcliffe IC, Hogg SD. Extraction of lipoteichoic acid from *Streptococcus mutans* with the nonionic detergent Triton-X- 114. *J Microbiol Methods.* 1993; 17(3): 215-25.
113. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90(3): 294-303.
114. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from "Who are they?" to "What are they doing?". *J Dent Res.* 2015; 94(12): 1628-37.
115. Tanzer JM, Freedman ML, Fitzgerald RJ. Virulence of mutants defective in glucosyltransferase, dextran mediated aggregation, or dextranase activity. In: Mergenhagen, Rosan, eds. *Molecular basis of oral microbial adhesion.* Washington DC: American society for microbiology; 1985.
116. Tanzer JM, Thompson A, Sharma K, Vickerman MM, Haase EM, Scannapieco FA. *Streptococcus mutans* out-competes *Streptococcus gordonii* in vivo. *J Dent Res.* 2012; 91(5): 513-9.
117. Takahashi N, Yamada T. Effects of pH on the glucose and lactate metabolisms by the washed cells of *Actinomyces naeslundii* under anaerobic and aerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol.* 1999; 14(1): 60-5.
118. Torlakovic L, Klepac-Ceraj V, Ogaard B, Cotton SL, Paster BJ, Olsen I. Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *J Oral Microbiol.* 2012; 4: e16125.

119. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG, Bowen WH. Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(3): 291-8.
120. 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.
121. Van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IG. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; 70(1): 157–76.
122. Weyne S. *Dentística: procedimientos preventivos e restauradores*. Rio de Janeiro: Quintessence; 1989.
123. Xiao J, Klein MI, Delahunty CM, Yates III JR, Lu B, Heydorn A, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4): e1002623.
124. 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.
125. Yaling L, Tao H, Jingyi Z, Xuedong Z. Characterization of the *Actinomyces naeslundii* ureolysis and its role in bacterial aciduricity and capacity to modulate pH homeostasis. *Microbiol Res.* 2006; 161(4): 304–10.
126. Zhang X, Senpuku H. Dynamic changes in the initial colonization of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus gordonii* using a new animal model. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(1): 11-6.
127. Zimmerman JN, Custodio W, Hatibovic-Kofman S, Lee YH, Xiao Y, Siqueira WL. Proteome and peptidome of human acquired enamel pellicle on deciduous teeth. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(1): 920-34

APÊNDICE A

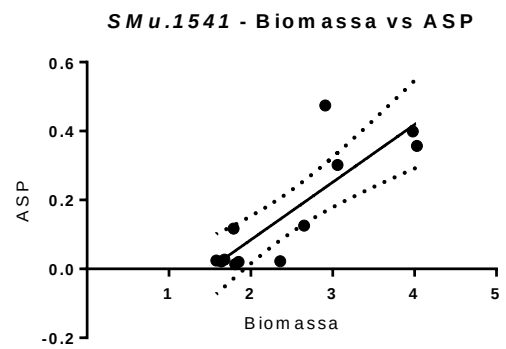
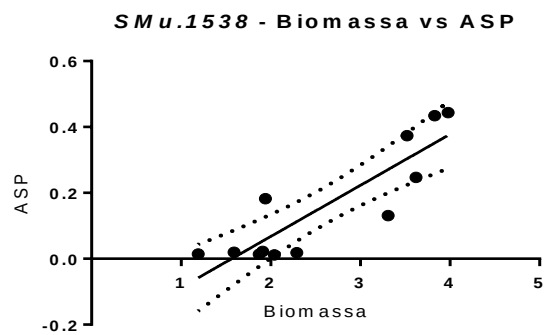
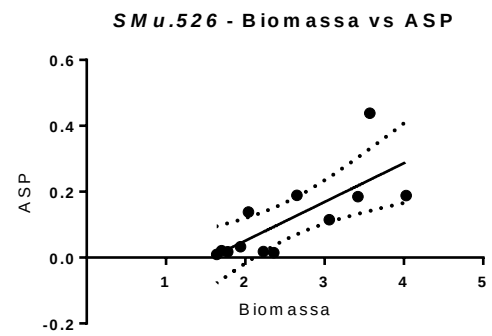
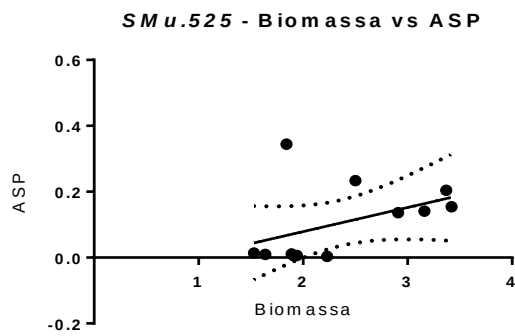
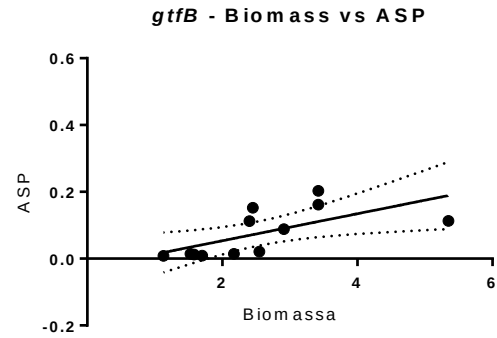
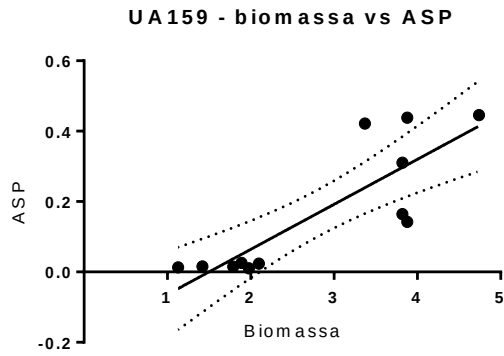
Dados de correlação entre Biomassa e ASP de biofilmes monoespécie.



BIOMASSA vs. ASP BIOFILMES MONOESPÉCIE		
UA159	P<0,001	Significante
	R= 0,7854	
<i>ΔgtfB</i>	P= 0,481	Não significativa
	R= 0,2315	
<i>ΔSMu.525</i>	P= 0,045	Significante
	R= 0,5044	
<i>ΔSMu.526</i>	P= 0,013	Significante
	R= 0,521	
<i>ΔSMu.1538</i>	P<0,001	Significante
	R= 0,7056	
<i>ΔSMu.1541</i>	P= 0,009	Significante
	R= 0,5062	

APÊNDICE B

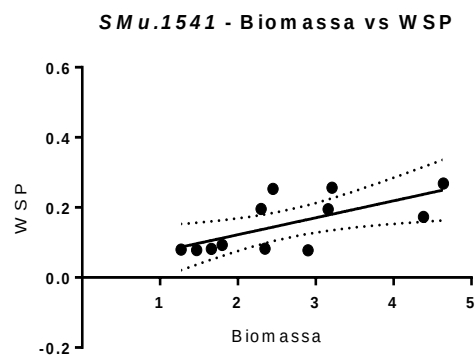
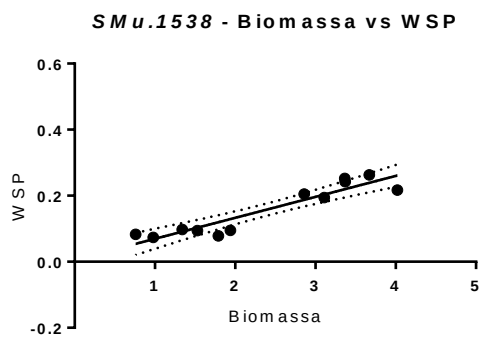
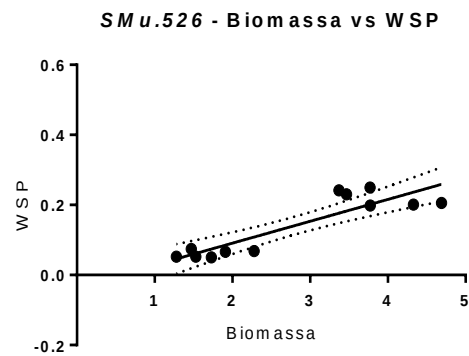
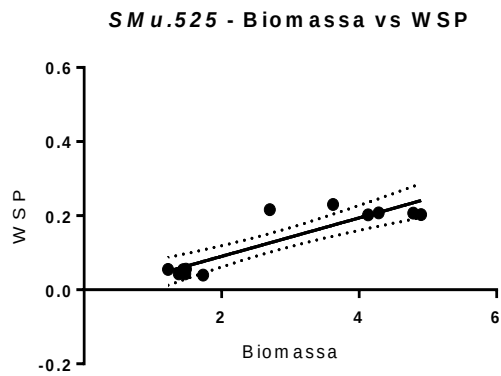
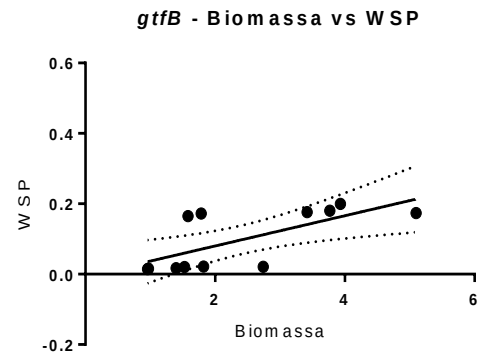
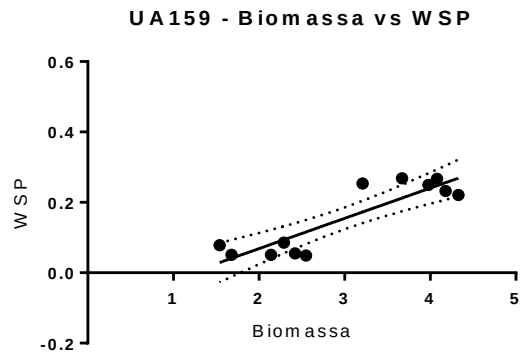
Dados de correlação entre Biomassa e ASP de biofilmes mistos.



BIOMASSA vs. ASP BIOFILMES MISTOS		
UA159	P<0,001	Significante
	R= 0,7125	
<i>ΔgtfB</i>	P= 0,022	Significante
	R= 0,4206	
<i>ΔSMu.525</i>	P= 0,153	Não significativa
	R= 0,1925	
<i>ΔSMu.526</i>	P= 0,004	Significante
	R= 0,5643	
<i>ΔSMu.1538</i>	P<0,001	Significante
	R= 0,7690	
<i>ΔSMu.1541</i>	P<0,001	Significante
	R= 0,7292	

APÊNDICE C

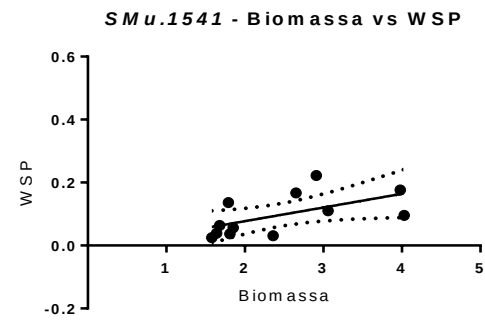
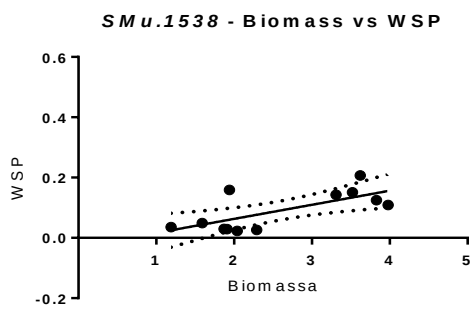
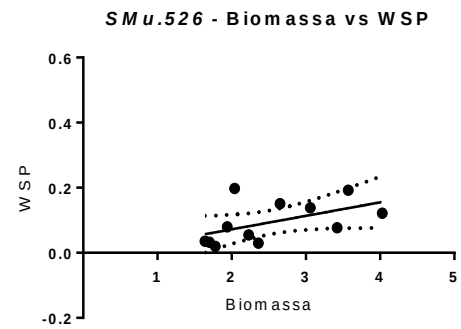
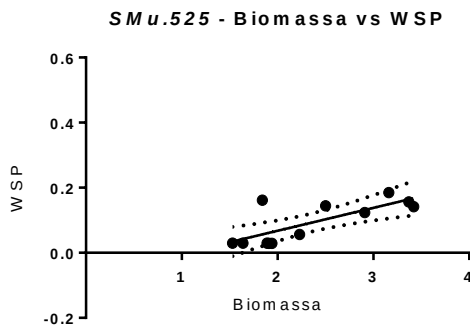
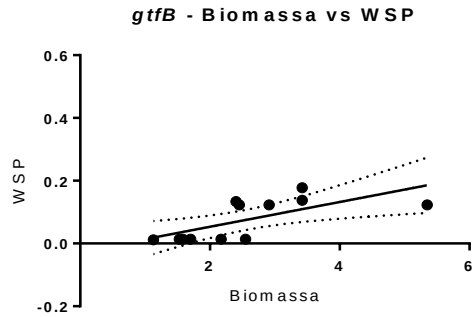
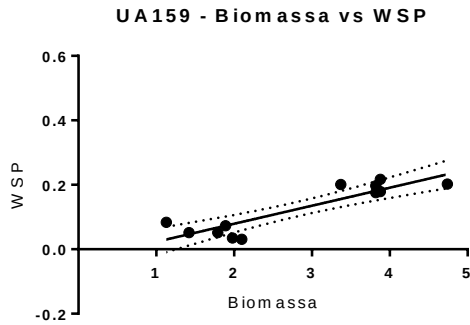
Dados de correlação entre Biomassa e WSP de biofilmes monoespécie.



BIOMASSA vs. WSP BIOFILMES MONOESPÉCIE		
UA159	P<0,001	Significante
	R= 0,7838	
<i>ΔgtfB</i>	P= 0,0129	Significante
	R= 0,4771	
<i>ΔSMu.525</i>	P<0,001	Significante
	R= 0,8067	
<i>ΔSMu.526</i>	P<0,001	Significante
	R= 0,8010	
<i>ΔSMu.1538</i>	P<0,001	Significante
	R= 0,8710	
<i>ΔSMu.1541</i>	P= 0,018	Significante
	R= 0,4393	

APÊNDICE D

Dados de correlação entre Biomassa e WSP de biofilmes mistos.



BIOMASSA vs. WSP BIOFILMES MISTOS		
UA159	P=0,001	Significante
	R= 0,8067	
<i>ΔgtfB</i>	P= 0,013	Significante
	R= 0,4736	
<i>ΔSMu.525</i>	P= 0,004	Significante
	R= 0,5770	
<i>ΔSMu.526</i>	P= 0,0815	Não significativa
	R= 0,2728	
<i>ΔSMu.1538</i>	P= 0,010	Significante
	R= 0,4947	
<i>ΔSMu.1541</i>	P= 0,045	Significante
	R= 0,3418	

APÊNDICE E

Médias e desvio padrão dos componentes de biofilmes monoespécie de cada cepa avaliada em duas idades.

Cepas	Idade	UFC/ biofilme	Biomassa (mg)	eDNA (ng)	ALT (mg)	ASP (mg)	WSP (mg)
UA159	67h	3,3E+06±3,2E+05	2,10±0,41	469,9±42,4	0,04±0,02	0,03±0,01	0,06±0,02
	115h	2,3E+06±1,9E+06	3,91±0,41	318,3±50,3	0,07±0,04	0,26±0,06	0,25±0,02
<i>ΔgtfB</i>	67h	9,9E+06±6,2E+05	1,57±0,66	166,9±24,0	0,05±0,02	0,01±0,00	0,02±0,00
	115h	7,7E+06±1,9E+06	3,26±1,35	257,0±12,7	0,08±0,01	0,16±0,07	0,18±0,01
<i>ΔSMu525</i>	67h	6,1E+06±1,9E+06	1,45±0,17	471,2±44,0	0,04±0,02	0,04±0,02	0,05±0,01
	115h	4,2E+06±3,8E+06	4,07±0,82	412,0±9,7	0,05±0,02	0,29±0,09	0,21±0,01
<i>ΔSMu526</i>	67h	5,7E+06±6,4E+05	1,70±0,36	464,1±70,3	0,03±0,01	0,05±0,02	0,06±0,01
	115h	3,3E+06±1,7E+06	3,90±0,51	482,8±120,3	0,05±0,06	0,31±0,10	0,22±0,02
<i>ΔSMu1538</i>	67h	2,6E+06±6,2E+05	1,39±0,46	258,1±58,9	0,05±0,01	0,04±0,03	0,09±0,01
	115h	3,5E+06±3,1E+06	3,40±0,41	302,3±71,1	0,07±0,02	0,26±0,12	0,23±0,03
<i>ΔSMu1541</i>	67h	7,9E+05±4,1E+05	1,65±0,49	251,5±87,7	0,06±0,01	0,04±0,03	0,08±0,01
	115h	3,4E+06±3,4E+06	3,36±0,97	275,2±18,5	0,07±0,01	0,25±0,11	0,22±0,04

(Media ± desvio padrão)

APÊNDICE F

Médias e desvio padrão dos componentes de biofilmes mistos de cada cepa avaliada em duas idades.

Cepas	Idade	UFC/ biofilme	Biomassa (mg)	eDNA (ng)	ALT (mg)	ASP (mg)	WSP (mg)
UA159	67h	5,6E+05±2,4E+05	1,55±0,48	326,7±178	0,03±0,01	0,015±0,006	0,06±0,02
	115h	1,6E+06±3,7E+05	3,92±0,45	342,7±33,8	0,06±0,01	0,320±0,139	0,20±0,02
<i>ΔgtfB</i>	67h	5,6E+05±1,2E+05	1,78±0,50	306,3±93,3	0,04±0,01	0,011±0,004	0,02±0,00
	115h	1,6E+06±1,5E+05	3,32±1,09	309,7±123	0,06±0,02	0,139±0,042	0,14±0,02
<i>ΔSMu525</i>	67h	5,7E+05±8,4E+04	1,57±0,59	317,0±125	0,03±0,01	0,010±0,003	0,03±0,01
	115h	1,7E+06±1,8E+05	2,86±0,61	500,9±42,6	0,05±0,01	0,202±0,080	0,15±0,02
<i>ΔSMu526</i>	67h	5,8E+05±6,9E+04	1,77±0,59	305,6±107	0,03±0,00	0,018±0,006	0,04±0,01
	115h	1,6E+06±2,0E+05	3,13±0,71	489,0±38,4	0,03±0,02	0,209±0,080	0,15±0,05
<i>ΔSMu1538</i>	67h	5,4E+05±5,1E+04	1,73±0,52	324,7±127	0,05±0,00	0,015±0,003	0,04±0,01
	115h	1,2E+06±4,0E+05	3,37±0,74	324,4±58,3	0,06±0,01	0,302±0,117	0,15±0,03
<i>ΔSMu1541</i>	67h	5,0E+05±1,6E+05	1,82±0,28	357,9±54,1	0,04±0,00	0,019±0,005	0,05±0,01
	115h	1,2E+06±4,7E+05	3,07±0,85	318,9±74,9	0,07±0,01	0,296±0,146	0,15±0,05

(Media ± desvio padrão)

ANEXO A

Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa da faculdade de odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA - UNESP	
--	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Função de DNA extracelular e de ácidos lipoteicóicos na matriz extracelular de biofilmes cariogênicos.

Pesquisador: MARLISE INÊZ KLEIN

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31717914.3.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 748.142

Data da Relatoria: 13/08/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto apresentado de forma clara e objetiva, com todos os detalhes necessários para análise.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos desse projeto são: 1) elucidar a função de eDNA e ALT nas propriedades estruturais e funcionais da MEC (matriz extracelular); 2) determinar a dinâmica de expressão dos genes de *S. mutans* associados com eDNA e ALT em biofilme cariogênico misto; 3) examinar o papel de eDNA e ALT na colonização dentária e na formação de biofilme in vivo usando um modelo animal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram avaliados pelo pesquisador responsável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo proverá base para terapias direcionadas aos elementos importantes na construção da MEC (matriz extracelular) para prevenir e/ou atenuar biofilmes patogênicos. Portanto estudo de relevância para a área em questão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos foram apresentados adequadamente.

Endereço: HUMAITA 1680		CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO		
UF: SP	Município: ARARAQUARA	
Telefone: 1633-0164	Fax: 1633-0164	E-mail: cep@foar.unesp.br, mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 748.142

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências para o projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião de 26 de junho de 2014, considero APROVADO o protocolo.

ARARAQUARA, 12 de Agosto de 2014

Assinado por:
Maurício Meirelles Nagle
(Coordenador)

Não autorizo a reprodução deste trabalho, até 12 de agosto de 2018.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 12 de agosto de 2016.