



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



ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
***Streptococcus mutans* EM BIOFILME CARIOGÊNICO.**

Araraquara

2017



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



ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
***Streptococcus mutans* EM BIOFILME CARIOGÊNICO.**

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

2017

Florez Salamanca, Elkin Jahir

Influência da matriz extracelular na expressão gênica de *Streptococcus mutans* em biofilme cariogênico / Elkin Jahir Flórez Salamanca. -- Araraquara: [s.n.], 2017

126 f.; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

1. Biofilmes 2. Cárie dentária 3. Expressão gênica 4. Matriz extracelular 5. *Streptococcus mutans* I. Título

ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

**INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
Streptococcus mutans EM BIOFILME CARIOGÊNICO**

Comissão Julgadora:

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e orientador: Profa. Dra. Marlise Inês Klein Furlan

2ºExaminador: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

3ºExaminador: Profa. Dra. Cristiane Duque

Araraquara 18/05/17

DADOS CURRICULARES

ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

NASCIMENTO: 28/03/1988 – Bucaramanga, Santander – Colômbia

FILIAÇÃO: Ana Ines Salamanca Maluendas (Mãe)
Domingo Florez Jaimes (Pai)

2015/Atual Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado
Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara- Brasil

2005/2011 Curso de Graduação em Odontologia
Universidad Santo Tomas de Aquino Bucaramanga, Santander -
Colômbia

AGRADECIMENTOS

Durante uma palestra na Universidade de Cornell em 1994, Carl Sagan apresentou para o público “o pálido ponto azul”, uma fotografia do planeta Terra feita em 14 de fevereiro de 1990, pela sonda espacial Voyager 1 a uma distância de cerca de 6,4 bilhões de quilômetros, aproveitando o momento compartilhou suas reflexões sobre o significado mais profundo por trás da ideia do pálido ponto azul:

“Desse ponto de observação, a Terra talvez não apresentasse nenhum interesse especial. Para nós, no entanto, ela é diferente. Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos, de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas.

... todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, “superastros”, “líderes supremos”, todos os santos e pecadores da história da nossa espécie, ali – num grão de poeira suspenso num raio de sol. A Terra é um palco muito pequeno em uma imensa arena cósmica.

...Nossas atitudes, nossa pretensa importância, a ilusão de que temos uma posição privilegiada no Universo, tudo é posto em dúvida por esse ponto de luz pálida. O nosso planeta é um pontinho solitário na grande escuridão cósmica circundante. Em nossa obscuridade, em meio a toda essa imensidão, não há nenhum indício de que, de algum outro mundo, virá socorro que nos salve de nós mesmos.

... Talvez não exista melhor comprovação da loucura das vaidades humanas do que esta distante imagem de nosso mundo minúsculo. Para mim, ela sublinha a responsabilidade de nos relacionarmos mais bondosamente uns com os outros e de preservarmos e amarmos o pálido ponto azul, o único lar que conhecemos” ¹³⁸.

Com este pensamento, só quero agradecer a cada uma das pessoas amáveis com as quais convivo e compartilho, que tem facilitado este período de aprendizado. Obrigado por toda paciência, apoio e orientação, graças a vocês, humildemente, posso afirmar que estou fazendo um aporte de escala molecular para um universo de dimensões cósmicas.

Aproveito também para agradecer as instituições que fizeram possível o desenvolvimento da pesquisa: à Faculdade de Odontologia da UNESP por disponibilizar equipamentos e laboratórios, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro brindado mediante o processo 2014/054230 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa 830071/20008.

Florez Salamanca EJ. Influência da matriz extracelular na expressão gênica de *Streptococcus mutans* em biofilme cariogênico [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Resumo

A cárie representa a doença humana mais prevalente no mundo, sua etiologia é dependente de biofilme e da dieta. Os biofilmes são comunidades altamente dinâmicas e estruturadas de células microbianas que se encontram embebidas em uma matriz extracelular tridimensional (MEC). Esta estrutura age como uma barreira que limita a difusão e fornece estabilidade e proteção aos microrganismos. *Streptococcus mutans* tem um potencial acidogênico e acidúrico, orchestra a construção do biofilme e modula sua virulência, produzindo ácidos lipoteicóicos (LTA), DNA extracelular (eDNA) e exopolissacarídeos (EPS), promovendo assim a adesão e coesão microbiana. Ao mesmo tempo a MEC produzida dificulta a difusão de metabólitos no biofilme. O objetivo do estudo foi determinar por meio de RT-qPCR a dinâmica da expressão de genes de *S. mutans* associados ao metabolismo de LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), eDNA (*lytST*, *lrgAB*, *ccpA*) e exopolissacarídeos (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*), durante o desenvolvimento da MEC de biofilmes mistos em um estudo longitudinal. Biofilmes mistos de *S. mutans* UA159 (cepa parental) ou Δ *gtfB* (mutante com deleção do gene *gtfB*), *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 e *Streptococcus gordonii* DL-1 foram formados em discos de hidroxiapatita revestidos de película salivar, e cultivados a 37° C e 5% de CO₂ em caldo triptona e extrato de levedura contendo 25% de saliva e alternando 0,1% de sacarose (escassez) e 0,5% de sacarose + 1% de amido (abundância). O pH do meio de cultura manteve-se ácido durante o período experimental, sendo menor após longos períodos de incubação. Todos os genes foram expressos em todas as idades (29, 43, 55, 67, 79, 91, 103 e 115 horas) nos dois tipos de biofilme, apresentado níveis distintos. Os genes associados ao LTA e EPS foram expressos de um modo semelhante, tendo maiores níveis de expressão duas horas após o fornecimento de carboidratos o mesmo comportamento foi registrado para as duas cepas, com maiores níveis de expressão para UA159 parental. Os genes associados a eDNA apresentaram uma dinâmica de expressão diferente entre a cepa parental e a cepa Δ *gtfB*. Para UA159 os genes *lrgAB* foram altamente expressos em 29h, e não demonstram ter uma relação com os genes *lytST*, enquanto que no biofilme Δ *gtfB* observou-se uma

relação inversa entre *lytS* e *lrgAB* nos horários em que o meio estava “fresco” (duas horas após a troca). Para os dois biofilmes o gene *lytT* apresentou os níveis de expressão mais baixos sem ter diferenças entre os horários. O produto do gene *ccpA* ativa ou reprime a expressão de determinados genes como resposta à disponibilidade de carboidratos, e esta relação com carboidratos foi evidente para UA159. Portanto, a deleção de *gtfB* influencia a dinâmica de expressão dos genes avaliados, diminuindo a magnitude de expressão principalmente dos genes associados com EPS, e alternando o perfil de expressão de genes associados com a presença de eDNA na matriz extracelular.

Palavras-chave: Biofilmes. Cárie dentária. Expressão gênica. Matriz extracelular. *Streptococcus mutans*.

Florez Salamanca EJ. Influence of the extracellular matrix on *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

Dental caries represents the most prevalent human disease worldwide, its etiology is biofilm-diet dependent. Biofilms are highly dynamic and structured communities of microbial cells that are enmeshed in a three-dimensional extracellular matrix (ECM). This structure acts as a diffusion-limiting barrier providing stability and protection to the microorganisms. *Streptococcus mutans* is acidogenic, aciduric, and orchestrates the biofilm build-up process. It modulates the biofilm's virulence by producing lipoteichoic acids (LTA), extracellular DNA (eDNA) and exopolysaccharides (EPS), thereby promoting microbial adhesion and cohesion. The resulting ECM hinders diffusion in the biofilm. The aim of the study was to determine via RT-qPCR the dynamics of expression of *S. mutans* genes associated with LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), eDNA (*lytST*, *lrgAB*, *ccpA*) and exopolysaccharides (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*) metabolism, during ECM development in mixed-species biofilm by time-lapse studies. Mixed-species biofilms of *S. mutans* UA159 (parental strain) or Δ *gtfB* (mutant with deletion of the gene *gtfB*), *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 and *Streptococcus gordonii* DL-1 were formed onto saliva-coated hydroxyapatite discs. These biofilms were cultivated at 37°C and 5% CO₂ in triptone with yeast extract containing saliva 25% and alternating 0.1% sucrose (scarcity) and 0.5% sucrose + 1% starch (abundance). The pH of the spent media remained acid during the experimental periods, and was lower after prolonged incubation periods. All genes were expressed at distinct levels in both biofilm types at all ages (29, 43, 55, 67, 79, 91, 103 and 115 hours). Genes associated with LTA and EPS were expressed in a similar way, having higher expression levels two hours after providing carbohydrates. Both strains presented similar expression profile, with higher expression levels in UA159 biofilm. Genes associated with eDNA presented a different expression dynamic between the parental strain and Δ *gtfB* strain. In UA159 biofilms *lrgAB* genes were highly expressed at 29h, and did not appear to be related with *lytST* genes, while in Δ *gtfB* biofilms an inverse relationship between *lytS* and *lrgAB* was detected at times when the medium was "fresh" (two hours after medium change). For both

biofilms, the *lytT* gene presented the lowest expression levels, without having differences between the periods. The product of *ccpA* gene activates or represses the expression of certain genes as a response to the carbohydrates availability, this phenomenon more evident in UA159 biofilm. Therefore, the deletion of *gtfB* influences the expression dynamics of the evaluated genes, decreasing both the magnitude of the expression of genes associated with EPS, and changing the expression profile of associated genes with the presence of eDNA in the matrix.

Key words: Biofilms. Dental caries. Extracellular matrix. Gene expression. *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Cárie Dental.....	14
2.1.1 Definição.....	14
2.1.2 Epidemiologia da cárie.....	16
2.2 Biofilme Dental.....	18
2.2.1 Definição.....	18
2.2.2 Formação do biofilme.....	19
2.2.3 Microrganismos cariogênicos.....	21
2.3 Matriz Extracelular de Biofilme	22
2.3.1 Exopolissacarídeos.....	23
2.3.2 DNA extracelular (eDNA).....	27
2.3.3 Ácidos lipoteicóicos (LTA).....	29
2.4 Microrganismos e Genes de Interesse Envolvidos no Desenvolvimento da Cárie.....	32
3 PROPOSIÇÃO.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO.....	42
4.1 Delineamento e Padronização de Primers.....	42
4.1.1 Delineamento.....	42
4.1.2 Padronização.....	44
4.2 Formação de Biofilmes.....	58
4.2.1 Preparo dos biofilmes.....	58
4.2.2 Formação de película salivar.....	58
4.2.3 Inóculo bacteriano e formação do biofilme misto.....	59
4.3 Isolamento do RNA e Síntese de cDNA para Análise da Dinâmica da Expressão Gênica dos Biofilmes Via qPCR.....	63
4.3.1 Remoção e processamento do biofilme.....	63
4.3.2 Isolamento do RNA.....	64
4.3.3 Síntese de cDNA.....	67
4.3.4 Expressão gênica via qPCR.....	68
4.4 Análises Estatísticas.....	69

5 RESULTADOS.....	70
5.1 Dinâmica do pH do Meio de Cultura Durante o Crescimento dos Biofilmes.....	70
5.2 Dinâmica de Expressão Gênica de <i>S. mutans</i> em Biofilmes Mistos.....	71
5.2.1 Dinâmica de expressão gênica de <i>S. mutans</i> UA159.....	71
5.2.2 Dinâmica de expressão gênica de <i>S. mutans</i> Δ gtfB.....	80
5.3 Comparação da Expressão Gênica entre os Biofilmes Formados pelas Cepas de <i>S. mutans</i> Parental UA159 e Mutante Δ gtfB.....	88
6 DISCUSSÃO.....	98
7 CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXO A.....	124

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes são considerados uma das formas de vida mais bem-sucedidas, pois são comunidades de células microbianas que se organizam dentro de um microambiente fornecido pela matriz extracelular ³⁹. Essa matriz extracelular (MEC) é fundamental para a existência dos biofilmes, pois a mesma fornece uma estrutura tridimensional que gera estabilidade, além de afetar a distribuição e difusão de produtos metabólicos dos microrganismos dessas comunidades (tanto nos ambientes internos do biofilme, quanto no externo que circunda o biofilme) deixando-os disponíveis para serem utilizados por outros organismos que habitam o biofilme ³⁹.

Streptococcus mutans é considerado um dos principais microrganismos associados ao desenvolvimento da cárie dentária. Ele produz exoenzimas glucosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftf) para a formação da MEC rica em exopolissacarídeos quando sacarose e amido estão disponíveis ¹⁶. Ainda, DNA extracelular (eDNA) e ácidos lipoteicóicos (LTA do inglês *lipoteichoic acids*) extracelulares são detectados em elevadas quantidades em biofilmes cariogênicos ^{22, 125, 137}.

Os açúcares da dieta que são fermentados por *S. mutans* e outros organismos acidogênicos facilitam a formação de microambientes altamente ácidos (pH 4,5 – 5,5) dentro do biofilme e na interface do biofilme - superfície de hidroxiapatita ¹⁷⁶. À medida que ácidos são produzidos e mantidos dentro do biofilme (sem neutralização pela saliva), o estresse ácido aumenta, a diversidade microbiana é reduzida, o que favorece a proliferação de uma microbiota acidogênica e altamente tolerante ao ácido ¹⁵⁷. Consequentemente, a acidez local assegura o crescimento do biofilme e a dissolução do tecido mineralizado.

O entendimento dos mecanismos biológicos responsáveis pela construção da MEC de biofilmes cariogênicos é necessário para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas, tornando-se importante esclarecer a influência dos componentes da MEC na expressão gênica de *S. mutans* e de sua virulência. Portanto, no presente estudo foi avaliado a expressão dos genes associados com metabolismo de eDNA (*lytST*, *lrgAB*, *ccpA*) e

de LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), bem como de genes relacionados à produção de exopolissacarídeos da MEC (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*) usando biofilmes mistos in vitro com cepa parental e cepa mutante com deleção do gene *gtfB*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cárie Dental

2.1.1 Definição

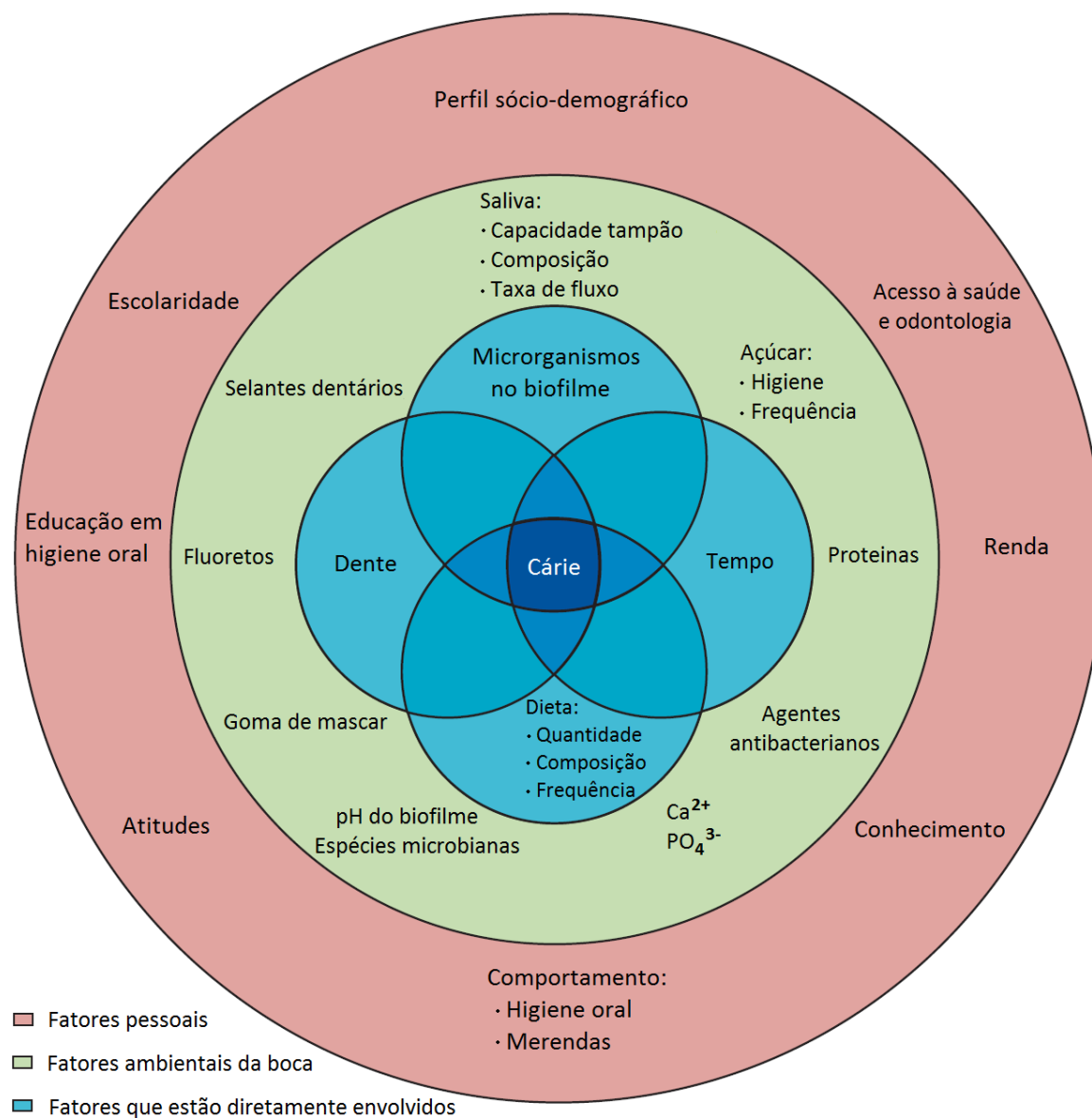
A cárie é uma doença crônica caracterizada pela perda de minerais (desmineralização) das estruturas dentárias. Este processo é causado por produtos metabólicos microbianos específicos, entre eles os ácidos orgânicos que vem da placa microbiana, também conhecida como biofilmes dentais (Kidd, Fejerskov⁷⁵, 2004; Selwitz et al.¹⁴⁶, 2007). Esta patologia é considerada como natural dado que a desmineralização sempre vai estar presente em níveis microscópicos (afetando os cristais de hidroxiapatita do esmalte). Por outro lado, os íons cálcio, fosfato e flúor provenientes da saliva contribuem no processo de remineralização, razão pela qual é considerado um processo dinâmico de des-remineralização (Hicks et al.^{58, 59}, 2003; 2004).

A aderência microbiana e o estabelecimento de biofilme cariogênico se devem a um desequilíbrio nas interações complexas entre microrganismos orais, hospedeiro e dieta ao longo do tempo, ocasionando uma perda de tecido mineralizado (Marsh⁹⁸, 2003; Fejerskov³⁵, 2004; Kidd, Fejerskov⁷⁵, 2004; Selwitz et al.¹⁴⁶, 2007). Existem vários modelos que incluem esses fatores (Keyes⁷⁴, 1960; Newbrun¹¹², 1979; Fejerskov, Manji³⁴, 1990; Selwitz et al.¹⁴⁶, 2007) e evidenciam a multifatorialidade da cárie, que ocorre somente quando todos os fatores em conjunto geram as condições favoráveis para que o biofilme se torne cariogênico (Figura 1).

Devido à etiologia da doença cárie, tem-se procurado estratégias para preveni-la, modificando algum dos fatores. O método preventivo mais utilizado é a remoção mecânica da placa microbiana mediante higiene oral com escovas dentais (recomendado um mínimo de três vezes por dia) e fio dental (recomendado uma vez no dia) (Sahin et al.¹³⁹, 2016; van der Weijden et al.¹⁶⁷, 2005; Morris et al.¹⁰⁹, 2001). Concomitantemente a esses meios mecânicos, a utilização de agentes fluretados é o pilar para prevenção da cárie, pois ajuda no processo de remineralização e afeta o metabolismo bacteriano, reduzindo a produção de ácido; no entanto, ele oferece uma proteção incompleta contra a cárie (Ten Cate¹⁶⁰, 2012; Manji, Fejerskov⁹⁴, 1990; Hicks et al.⁶⁰, 2004; Cury et al.²⁶, 2016). A modificação da dieta seria também uma alternativa promissora, porém é pouco realista, pois a sacarose e o amido são

os carboidratos predominantes na dieta da sociedade moderna, e a combinação deles resulta em uma elevação da cariogenicidade da sacarose (Bowen et al.¹⁵, 1980; Firestone et al.³⁶, 1982; Fu, Robyt⁴¹, 1991).

Figura 1- Fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie



Resumo dos fatores de risco que se encontram relacionados ao desenvolvimento da cárie dental. Em rosa estão fatores pessoais, em verde fatores ambientais da cavidade bucal e em azul os fatores diretamente implicados na doença.

Fonte: Adaptado de Selwitz et al.¹⁴⁶, 2007.

2.1.2 Epidemiologia da cárie

A cárie dental representa uma das doenças humanas mais prevalentes no mundo inteiro, é uma das principais causas de visitas à centros de emergência, tornando-se um problema de saúde pública preocupante (Bagramian et al.⁸, 2009; Dye et al.³², 2007). Segundo o que foi relatado no dia 24 de fevereiro de 2004 em Genebra pela Dra. Catherine Le Gales-Camus, subdiretora geral do departamento de doenças não transmissíveis e saúde mental da Organização Mundial da Saúde (OMS), a cárie dental afeta entre 60-90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos, porém se tem a percepção errônea que não afeta os países desenvolvidos (World Health Organization¹⁷², 2004).

Globalmente, a prevalência de cárie teve um aumento acentuado, afetando tanto a dentição decídua quanto a dentição permanente (Marcenes et al.⁹⁶, 2013). Em 2010 se estimou que em todo o mundo, ao redor de 2,4 bilhões de pessoas apresentavam lesões de cárie não tratadas nos dentes permanentes, no caso da dentição decídua, 621 milhões de crianças eram afetadas (Kassebaum et al.⁷³, 2015). Apesar de existir variações na prevalência da cárie entre países e regiões, de forma geral, pode-se afirmar que indivíduos de todas as idades são susceptíveis a desenvolvê-la. Encontram-se 3 picos de manifestação da doença nas idades de 6, 25 e 70 anos (Kassebaum et al.⁷³, 2015). Da mesma forma, alguns períodos podem ser de maior susceptibilidade devido a mudanças fisiológicas como a erupção dentária ou a hipossalivação (Rogers et al.¹³⁴, 2015; Srinivasan et al.¹⁵³, 2015; Ouanounou¹¹⁹, 2016; Hayes et al.⁵⁵, 2016)

Também é amplamente aceito que a cárie é a doença mais prevalente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Petersen¹²⁷, 2008). No caso do Brasil, a prevalência de cárie nos dentes decíduos na idade de 5 anos é de 53,4%, nesta mesma idade ao ser avaliada experiência de cárie mediante o índice de dentes decíduos cariados extraídos e obturados (ceo-d) uma criança possui em média 2,43, sendo o componente cariado responsável por 80,2% desse índice (Ministério da Saúde¹⁰⁸, 2012). Na idade de 12 anos, a prevalência de cárie em dentes permanentes é de 56,5%, e ao avalia-se a experiência mediante o índice de dentes permanentes Cariados Perdidos e Obturados (CPO-D) em média observou-se um valor de 2,07, novamente o componente cariado foi o que mais contribuiu 54,1%. (Ministério da Saúde¹⁰⁸, 2012). Na medida em que aumenta a idade, o comportamento do índice muda, sendo o componente perdido o tipo de problema de

saúde bucal em evidência na faixa etária de 35 a 44 anos; o CPO-D médio foi de 16,75 com 44,7% dentes perdidos e 27,53 na faixa de 65 a 74 com 92% dentes perdidos (Ministério da Saúde¹⁰⁸, 2012).

Portanto, fica evidenciado que essa doença gera grandes gastos nos sistemas integrados de saúde dos países. Segundo uma estimativa da OMS o tratamento de doenças orais está em torno de 5-10% dos custos de saúde nos países industrializados e pode ser maior nos países em desenvolvimento (World Health Organization¹⁷², 2004). Em muitos países, o acesso à serviços de saúde bucal são deficientes, afetando especialmente as comunidades carentes. Para reduzir este tipo de desigualdade, promover uma cobertura universal aos serviços de saúde e fazê-lo mais eficiente, alguns países estão reformando as políticas e os serviços públicos (World Health Organization¹⁷³, 2003; Petersen¹²⁷, 2008).

O governo Brasileiro, por meio do Ministério da Saúde em 2003, lançou a política nacional de saúde bucal *Brasil Sorridente* na qual se tem feito um investimento de mais de 8,2 bilhões de reais desde sua implementação até o ano 2015 (Ministério da Saúde¹⁰⁷, 2015 disponibilizado no URL: http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_brasil_sorridente.php). A participação do Estado Brasileiro construindo um quadro político normativo para a saúde bucal e sua procura em garantir a implementação do mesmo, ratifica que a saúde bucal é uma das quatro áreas prioritárias do Sistema Único de Saúde do Brasil (Soares¹⁴⁹ 2012; Pucca et al.¹²⁸, 2015).

As doenças bucais prejudicam de forma geral as pessoas e a sua qualidade de vida, gerando dor, sofrimento, diminuição na função e altos custos (Dye et al.³², 2007). Estima-se que no mundo, 3,9 bilhões de pessoas são afetadas por doenças orais, sendo a cárie a condição mais comum, apresentando uma prevalência global de 35% para todas as idades (Marcenes et al.⁹⁶, 2013). Estas doenças geraram, de forma global, uma média de 224 anos de licença médica (afastamento do trabalho) por cada 100.000 habitantes e ao serem comparadas as métricas do ano 1990 para 2010 observou-se aumento um 20,8% (Marcenes et al.⁹⁶, 2013; Kassebaum et al.⁷³, 2015).

2.2 Biofilme Dental

2.2.1 Definição

Estima-se que o corpo humano seja constituído por mais de 10^{14} células, das quais apenas 10% são células de mamífero, demonstrando a relação estreita e dinâmica que temos com os microrganismos, os quais compõem a microbiota humana (The Human Microbiome Project consortium¹⁶¹, 2012; Sanders, Sanders¹⁴¹, 1984; Nakano, Ooshima¹¹⁰, 2009). A cavidade bucal é um dos locais com maior densidade microbiana do corpo humano. Nela se têm identificado mais de 700 espécies de microrganismos vivendo em comunidade; esta diversidade microbiana, tanto em número quanto em abundância de distribuição, é considerada normal, pois pode ser detectada em seres humanos saudáveis (Takahashi, Nyvad¹⁵⁷, 2011; Paster¹²⁴, 2001; The Human Microbiome Project consortium¹⁶¹, 2012; Nakano, Ooshima¹¹⁰, 2009).

As células microbianas que habitam a cavidade bucal interagem entre elas, formando comunidades altamente dinâmicas, estruturadas e organizadas em biofilmes. Em biofilmes os microrganismos encontram-se imersos e rodeados substâncias poliméricas extracelulares hidratadas como: exopolissacarídeos (EPS), proteínas e ácidos nucleicos, os quais constroem uma estrutura tridimensional (3D) conhecida como matriz extracelular (MEC). A MEC por sua vez fornece suporte e proteção aos microrganismos (Branda et al.¹⁸, 2005; Flemming, Wingender³⁹, 2010; Wright et al.¹⁷⁵, 2013; Klein et al.⁷⁹, 2015). As propriedades e atividades fisiológicas que apresentam os microrganismos estando dentro dos biofilmes diferem dos comportamentos que eles têm quando se encontram em forma livre (ou planctônica), já que as células interagem de forma dinâmica com as mudanças, os sinais químicos e físicos do ambiente (Flemming et al.⁴⁰, 2016; Hwang, et al.⁶⁷, 2016).

A MEC é produzida por alguns microrganismos específicos e atua como um complexo estrutural 3D que serve para o desenvolvimento e maturação do biofilme, promovendo a adesão e coesão de numerosos e variados microrganismos, mantendo-os próximos e aumentando a comunicação e interação entre eles (Flemming, Wingender³⁹, 2010). Esta organização dificulta a difusão da saliva no biofilme, e a sua função como tamponante para neutralização dos produtos ácidos produzidos por microrganismos.

Dependendo das espécies de microrganismos que habitam o biofilme vão predominar alguns produtos metabólicos, os quais se acumulam e dão origem a microambientes (nichos) heterogêneos (Stewart, Franklin¹⁵⁵, 2008; Mann, Wozniak⁹⁵, 2012; Wozniak, Parsek¹⁷⁴, 2014; Klein et al.⁷⁹, 2015). No caso de biofilmes cariogênicos formados sobre os dentes seriam os ácidos orgânicos, os quais levam à acidificação do biofilme e posterior desmineralização de estruturas dentais (Xiao et al.¹⁷⁶, 2012). Os microrganismos que produzem e secretam substâncias poliméricas enriquecem a MEC, componente fundamental para a existência e desenvolvimento do biofilme, da mesma forma a MEC intervém para a expressão completa da virulência dos microrganismos patogênicos (Klein et al.⁷⁹, 2015; Ajdić⁶, 2002).

Após a erupção dentária, a microbiota oral se torna complexa (em quantidade e diversidade de espécies), pois o número de áreas retentivas é maior, tornando-se um ambiente favorável para colonização de bactéria cariogênicas (Sampaio-Maia, Monteiro-Silva¹⁴⁰, 2014; Mattos-Graner et al.⁹⁹, 2014). O biofilme dental ou placa microbiana é um fator predisponente para o desenvolvimento da cárie. No entanto, a presença deste não necessariamente indica a presença de cárie, porque depende dos fatores de virulência dos microrganismos que o compõem (Marsh⁹⁷, 1994). Entre os fatores, é importante ressaltar a atividade metabólica, pois são patogênicos os biofilmes que contêm maiores quantidades de microrganismos acidogênicos (capazes de produzir ácidos) e acidúricos (capazes de sobreviver em ambientes ácidos) já que levam a uma queda do pH até valores considerados “críticos”, iniciando o processo de desmineralização (Bowen¹⁷, 2013; Hicks et al.⁵⁸, 2003).

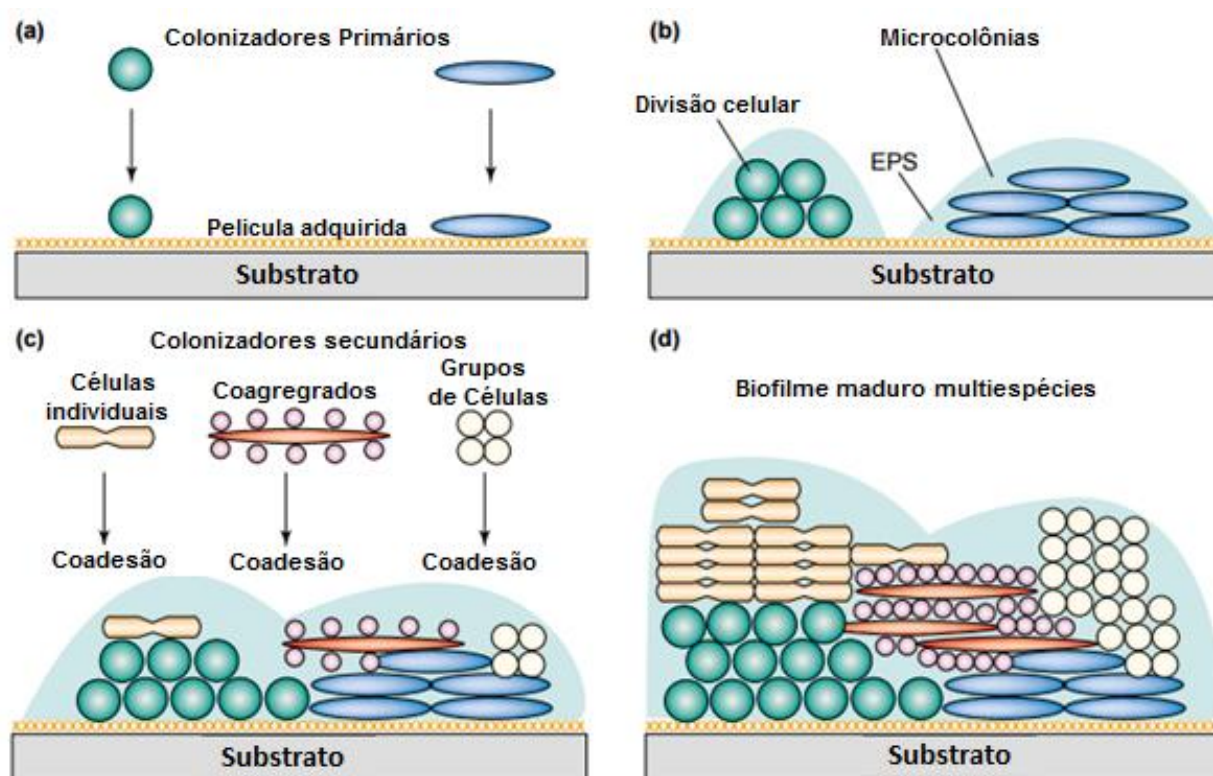
2.2.2 Formação do biofilme

A formação dos biofilmes passa por alguns estágios de desenvolvimento: condicionamento da superfície (depósito de glicoproteínas salivares sobre a superfície dentária) (Schilling, Bowen¹⁴⁴, 1988; Liljemark, Bloomquist⁹¹, 1996), adesão de colonizadores primários, coagregação dos colonizadores secundários e maturação do biofilme (Rickard et al.¹³², 2003; Hojo et al.⁶³, 2009; Igarashi et al.⁶⁸, 1990) (Figura 2).

Naturalmente, os dentes têm contato com a saliva e desta interação se forma uma película salivar em suas superfícies. A película está composta por 99% de água e 1% de compostos orgânicos e inorgânicos, entre eles: lipídios, aminoácidos,

minerais, glicoproteínas (mucinas, amilases, proteínas ricas em prolina, glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, imunoglobulinas A e G), enzimas de origem microbiana e do hospedeiro (glucosiltransferases, lisozimas, peroxidases) e até produtos bacterianos (eDNA, LTA, peptideoglicanos) (Guo, Shi⁴⁸, 2013; Siqueira et al.¹⁴⁷, 2007; Oppenheim et al.¹¹⁸, 2007; Levine⁸⁸, 2011).

Figura 2 - Desenvolvimento de biofilmes multiespécies



Coagregação no desenvolvimento de biofilmes multiespécies. (a) Colonização primária de hidroxiapatita coberta por película salivar; (b) crescimento e divisão celular, produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) que conduz ao desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de células individuais, grupos de células coagregadas e grupos de células iguais; e (d) maturação e formação de mosaicos clonais dentro do biofilme multiespécies.

Fonte: Adaptado de Rickard et al.¹³², 2003.

Alguns microrganismos têm afinidade para aderir a uma superfície, principalmente quando está em presença de componentes orgânicos (glicoproteínas), como acontece com a hidroxiapatita do esmalte dental. Entre esses microrganismos, encontramos bactérias dos gêneros *Streptococcus* (*Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*) e *Actinomyces* spp. (Nyvad, Kilian¹¹⁷, 1990; Nobbs et al.¹¹³, 2009; Wright, et al.¹⁷⁵,

2013). Uma vez aderidos, os microrganismos começam o crescimento e divisão celular e produção de EPS que conformam a MEC, isso leva ao desenvolvimento inicial de comunidades de microrganismos da mesma espécie também conhecido como microcolônias (Nobbs et al.¹¹³, 2009; Rickard et al.¹³², 2003; Hojo et al.⁶³, 2009).

Durante a formação das microcolônias, ocorrem as interações intercelulares que levam ao desenvolvimento do biofilme, por duas vias: coadesão de células individuais geneticamente distintas que se encontram na suspensão e coadesão de células que se encontram previamente coagregadas entre si na suspensão (Rickard et al.¹³², 2003). Os colonizadores primários facilitam o processo de coagregação servindo como substrato para outros microrganismos, e isso leva a um grande acúmulo de microrganismo e maturação do biofilme (Nobbs et al.¹¹³, 2009; Hojo et al.⁶³, 2009).

2.2.3 Microrganismos cariogênicos

Microrganismos produtores de ácido (ou acidogênicos) foram considerados por anos como os agentes etiológicos da cárie. Como exemplo, temos os *Lactobacillus* spp. e estreptococos do grupo mutans, especialmente a espécie *S. mutans* (Fitzgerald et al.^{38, 37}, 1980; 1981; Hamada, Slade⁵¹, 1980; Loesche⁹², 1986). Porém, se tem observado que outras propriedades também contribuem para a virulência, entre elas estão capacidade de: adesão, formação do biofilme, síntese de EPS, tolerância ao ácido (aciduricidade), produção de bacteriocinas tipo mutacinas (Takahashi¹⁵⁸, 2015; Banas¹¹, 2004; Lemos, Bunre⁸⁷, 2008; Grönroos et al.⁴⁴, 1998).

Assim, para o desenvolvimento da doença é preciso a interação de diferentes microrganismos de vários gêneros entre eles: *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Scardovia* spp., *Veillonella* spp., *Candida* spp. (Takahashi, Nyvad¹⁵⁷, 2011; Becker et al.¹³, 2002). Mudanças no habitat (cavidade bucal) podem romper a homeostase microbiana, alterando o equilíbrio entre estes microrganismos residentes (Marsh⁹⁸, 2003). Embora a microbiota seja variada e complexa, o gênero *Streptococcus* representa aproximadamente entre 10 e 20% das bactérias orais (Palmer¹²², 2014; Aas et al.¹, 2005). Dentre essas espécies, cabe ressaltar que *S. mutans* desempenha um papel importante na patogenicidade da cárie, mesmo não sendo a espécie mais numerosa, por possuir fatores de virulência específicos e,

portanto ainda é foco de muitos estudos (Valm et al.¹⁶⁶, 2011; Mattos-Graner et al.⁹⁹, 2014; Takahashi¹⁵⁸, 2015; Banas¹¹, 2004; Ajdić⁶, 2002).

S. mutans são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, que quando estão na presença de sacarose e amido proveniente da dieta do hospedeiro, tem uma grande capacidade de sintetizar EPS, influenciando a construção da MEC e a adesão de novas bactérias, por isto, afirma-se que essa espécie modula a formação de biofilme cariogênico (Firestone et al.³⁶, 1982; Duarte et al.³⁰, 2008; Ribeiro et al.¹³¹, 2005; Paes-Leme et al.¹²⁰, 2006). As fontes primárias de EPS no biofilme dentário são produtos da interação de glucosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftfs) com sacarose e hidrolisados de amido (Fu, Robyt⁴¹, 1991; Bowen, Koo¹⁶, 2011).

As Gtfs (i.e., GtfB, GtfC, GtfD) secretadas por *S. mutans* podem ser adsorvidas nas superfícies dos dentes tornando-se parte da película salivar e também nas superfícies dessa espécie e de outros microrganismos orais. GtfC adsorve preferencialmente à hidroxiapatita, enquanto GtfB tem maior afinidade pela superfície de microrganismos (Vacca-Smith, Bowen¹⁶⁴, 1998). Uma vez adsorvidas, as Gtfs, começam a sintetizar glucanos diretamente na superfície dentária e dos microrganismos convertendo os mesmos em produtores de glucano (Bowen, Koo¹⁶, 2011).

Os EPS sintetizados, in situ, permitem a adesão e acúmulo dos microrganismos nos dentes (Bowen, Koo¹⁶, 2011; Hannig, et al.⁵², 2008; Rölla et al.¹³⁶, 1983; Vacca-Smith, Bowen¹⁶⁴, 1998; Cross et al.²⁵, 2007). Com o passar do tempo, esses EPS ajudam a construir a matriz 3D que envolve e suporta as células, formando um ambiente altamente coesivo com difusão limitada, tanto para dentro quanto para fora do biofilme (Melvaer et al.¹⁰⁵, 1972; Xiao et al.¹⁷⁶, 2012; Koo et al.⁸², 2013), por isto se considera que *S. mutans* coordena a construção do biofilme cariogênico (Hamada, Slade⁵¹, 1980; Loesche⁹², 1986; Bowen, Koo¹⁶, 2011).

2.3 Matriz Extracelular de Biofilme

A estrutura 3D da MEC fornece estabilidade mecânica e proteção aos microrganismos contra defesas imunológicas, cátions metálicos, oxidação, desidratação e alguns antimicrobianos (Klapper et al.⁷⁶, 2002; Hwang et al.⁶⁶, 2014; Branda et al.¹⁸, 2005; Flemming, Wingender³⁹, 2010; Hope, Wilson⁶⁴, 2004). Apesar da MEC de biofilmes ter um alto conteúdo de EPS, existem outros constituintes tais

como: proteínas, lipídeos, lipopolisacarídeos, ácidos lipoteicóicos (LTA) e ácidos nucléicos - eDNA (Karatan, Watnick⁷², 2009; Schooling et al.¹⁴⁵, 2009; Ciardi et al.²⁴, 1981; Hogg, Lightfoot⁶¹, 1989; Jacques et al.⁶⁹, 1979; Perry et al.¹²⁵, 2009; Rölla et al.¹³⁷, 1980; Hardy et al.⁵³, 1981).

2.3.1 Exopolisacarídeos

Desde muito tempo, a dieta é observada como um dos fatores fundamentais para o desenvolvimento da cárie (Krasse⁸⁴, 2001; Parisotto et al.¹²³, 2015). Para sintetizar os EPS (componente essencial da MEC, e conhecido como fator de virulência no desenvolvimento da cárie) (Yamashita et al.¹⁷⁷, 1993; Mattos-Graner et al.¹⁰⁰, 2000; Vacca-Smith et al.¹⁶³, 2007; Ajdić⁶, 2002), as enzimas Gtfs e Ftfs precisam de sacarose. Além disso, se existir amido no sistema, ele pode ser hidrolisado, conseguindo intervir na produção e estruturação de substâncias poliméricas glucanos e frutanos. Os hidrolisados de amido servem como receptores de elétrons para a síntese de EPS (Fu, Robyt⁴¹, 1991). Todo processo de síntese e organização estrutural de EPS aumenta o potencial patogênico de *S. mutans* dentro de biofilmes, por sua capacidade de influenciar a organização 3D da MEC (Vacca-smith et al.¹⁶⁵, 1996; Van Hijum et al.¹⁶⁸, 2006; Bowen, Koo¹⁶, 2011; Hwang et al.⁶⁶, 2014; Klein et al.⁷⁸, 2009).

S. mutans expressa pelo menos três Gtfs (GtfB, GtfC e GtfD), as quais utilizam sacarose (e hidrolisados de amido) para síntese de glucanos solúveis (GtfD e GtfC) e insolúveis (GtfB e GtfC) em água (Bowen, Koo¹⁶, 2011; Venkitaraman et al.¹⁶⁹, 1995). Todas as Gtfs contribuem para a formação de um biofilme virulento, pois além de sintetizarem glucanos essas enzimas fazem a ligação dos mesmos às superfícies (Bowen, Koo¹⁶, 2011). Ao ser comparada com as outras Gtfs, a GtfB se liga com maior avidéz aos microrganismos orais (*Candida albicans*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*, *S. mutans*) devido a presença de um terminal com vários grupos carboxila promovendo um agrupamento denso de células, o que reforça a coesão da placa bacteriana (Gregoire et al.⁴³, 2011; Vacca-Smith, Bowen¹⁶⁴, 1998; Bowen, Koo¹⁶, 2011). Além disso, as enzimas que se ligaram aos microrganismos mantêm a sua atividade convertendo-os em produtores de glucanos (Vacca-Smith, Bowen¹⁶⁴, 1998; Bowen, Koo¹⁶, 2011).

A GtfC encontra-se principalmente como parte da película salivar adquirida. Esta afinidade se deve aos domínios hidrofóbicos que originam interações com

macromoléculas salivares específicas encontradas na película, incluindo peroxidase, lisozima e amilase (Vacca-Smith, Bowen¹⁶⁴, 1998; Bowen, Koo¹⁶, 2011, Scannapieco et al.¹⁴³, 1995). GtfD também se encontra na película adquirida, mas em menor quantidade e produz um polissacarídeo solúvel, facilmente metabolizável, que atua como um iniciador para GtfB (Bowen, Koo¹⁶, 2011).

Outras proteínas além das glucosiltransferases, conhecidas como proteínas para ligação de glucanos ou Gbps (do inglês *glucan binding proteins*) ajudam na ligação de *S. mutans* aos glucanos formados in situ (Banas, Vickerman⁹, 2003). Na espécie *S. mutans* foram identificadas 4 Gbps: GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (Haas, Banas⁴⁹, 1997; Banas et al.¹⁰, 1990; Banas, Vickerman⁹, 2003; Bowen, Koo¹⁶, 2011). Sugere-se que estas proteínas influenciam de forma geral na virulência e ajudam na manutenção e modelação da arquitetura do biofilme ligando bactérias à glucanos. Isto devido a um terminal de grupo carboxílico semelhante ao encontrado nas Gtfs (Lynch et al.⁹³, 2007).

Cada uma das Gbps parece ter um papel na adesão dependente de sacarose e formação de biofilmes por *S. mutans*. A proteína GbpA se encontra na superfície celular e no meio extracelular, contribui na aderência de *S. mutans* e na coesão do biofilme mediando as ligações de glucanos solúveis e insolúveis em água (Haas, Banas⁴⁹, 1997). Para esclarecer a função individual de cada uma das 4 Gbps identificadas, as cepas do *S. mutans* têm sido manipuladas geneticamente, removendo os genes, resultando em cepas *knockout* (K.O.).

Em modelo animal com dieta cariogênica (rica em sacarose) uma cepa K.O. de *S. mutans* $\Delta gbpA$ apresentou um comportamento hipercariogênico (Hazlett et al.⁵⁷, 1998). Também se observaram mudança na estrutura dos biofilmes formados in vitro; biofilmes de $\Delta gbpA$ apresentaram maior aderência ao vidro, porém microcolônias de menor altura ao serem comparadas com a cepa selvagem e com a mutante $\Delta gbpB$ (Hazlett et al.⁵⁶, 1999), concluindo-se que o microrganismo desenvolve estratégia de compensação na ausência de GbpA (Banas, Vickerman⁹, 2003).

Altas quantidades de GbpB foram correlacionadas com a capacidade de crescimento do biofilme em um ensaio in vitro (Hazlett et al.^{57, 56}, 1998, 1999; Mattos-Graner et al.^{102, 103}, 2001; 2006). Tentou-se esclarecer a sua função, mas a instabilidade de cepa mutante para o gene *gbpB* demonstra que o mesmo codifica uma proteína essencial para o ciclo celular e para a síntese da parede celular

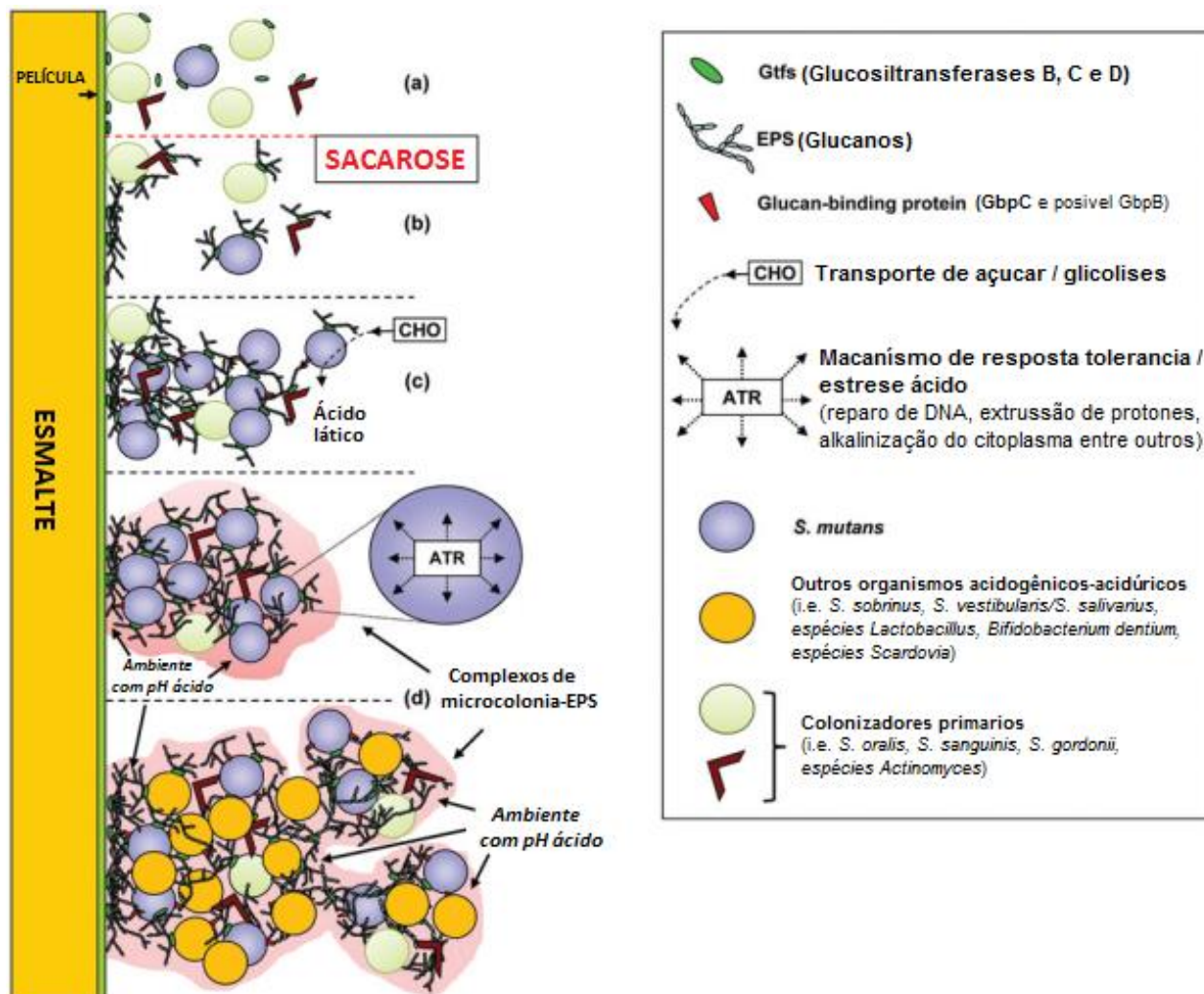
(Mattos-Graner et al.^{101, 103}, 2002; 2006). Ainda, observou-se que a construção de um mutante condicional mostrou alteração na forma da célula, redução da autólise, aumento da hidrofobicidade de células, aumento da sensibilidade aos antibióticos e às tensões osmóticas e oxidativas, prejudicando a formação inicial de biofilmes dependentes de sacarose (Duque, et al.³¹, 2011).

A ausência do gene *gbpC* reduz a capacidade de agregação das bactérias, resultando em bactérias individuais espalhadas no substrato em que o biofilme foi desenvolvido (Lynch et al.⁹³, 2007). A deleção do gene *gbpD* resultou numa queda significativa de quantidade de biomassa de biofilme, sendo o mesmo extremamente frágil (Banas, Vickerman⁹, 2003; Lynch et al.⁹³, 2007). Assim, a síntese das Gbps pode aumentar as interações entre *S. mutans* com a MEC rica em EPS, já que tem um impacto na formação, maturação, propriedades físicas, e nos locais que servem para ligação de bactérias (Hazlett et al.^{57, 56}, 1998, 1999; Mattos-Graner et al.¹⁰², 2001; 2006; Banas, Vickerman⁹, 2003; Lynch et al.⁹³, 2007). A acidificação do microambiente do biofilme influencia a síntese, união, remodelação e ramificação dos glucanos, mesmo em presença de Gtfs (Li, Brune⁸⁹, 2001).

Em adição, enzimas hidrolíticas produzidas por *S. mutans* e outros microrganismos que digerem e degradam EPS, especificamente frutanasase (FruA) e dextranase (DexA), interferem na estruturação, maturação e propriedades físicas da MEC rica em EPS, atuando em sua remodelação (Klein et al.⁸¹, 2012; Hayacibara et al.⁵⁴, 2004). Ainda, a digestão de frutanos por frutanasas e de glucanos por dextranasas fornecem substratos para o metabolismo de microrganismos presentes no biofilme. Os hidrolizados de glucanos servem como iniciadores e aceptores para a síntese de glucanos insolúveis por GtfB. Também os hidrolizados de glucanos e frutanos fornecem substratos adicionais para a produção de ácido (Hayacibara et al.⁵⁴, 2004; Walker et al.¹⁷⁰, 1981).

De forma geral, podemos observar as complexas interações que existem entre os microrganismos que secretam e adsorvem proteínas utilizadas na síntese e remodelagem dos EPS fundamentais na formação e manutenção da MEC, como é ilustrado na Figura 3 (Koo et al.⁸², 2013). Cabe mencionar que os EPS não estão distribuídos homogeneamente dentro do biofilme e sua densidade parece aumentada na interface com as superfícies dentárias (Reese, Guggenheim¹²⁹, 2007), podendo afetar o transporte de massa e propriedades de difusão dentro da estrutura do biofilme (Thurnheer et al.¹⁶², 2003; Robinson et al.¹³³, 2006).

Figura 3 - A síntese de exopolissacarídeos in situ ajuda na estruturação da MEC do biofilme



Sínteses de EPS in situ ajuda na estruturação da MEC do biofilme (a) Incorporação de Gtfs na película salivar. (b) Gtfs livres sintetizam glucanos a partir de sacarose e hidrolisados de amido. (c) Os glucanos formados ligam vários microrganismos, principalmente através de interações feitas pelas enzimas Gbps presentes no *S. mutans*. Além disso, as bactérias revestidas por Gtfs tornam-se produtoras de glucanos, levando à produção da matriz que fornece proteção e nichos ácidos. (d) Predominância e sobrevivência de espécies dependendo das condições dos nichos. Na exposição de sacarose se geram ácidos fermentáveis o que favorece a sobrevivência e dominância de organismos altamente tolerantes ao estresse ácido, promovendo a desmineralização do esmalte.

Fonte: Koo et al.⁸², 2013.

2.3.2 DNA extracelular (eDNA)

S. mutans produz eDNA por duas vias conhecidas: por autólise (Perry et al.¹²⁵, 2009; Allesen-Holm et al.⁷, 2006; Steinberger, Holden¹⁵³, 2005) e por secreção de microvesículas ou vesículas de membrana celular (Liao et al.⁹⁰, 2014). Tem-se a teoria de que o eDNA tem um papel importante na estrutura dos biofilmes, porém ainda não está bem elucidado. Foi demonstrado que remover o eDNA de bactérias Gram positivas reduzia a adesão e agregação sobre as superfícies de vidro, pois eDNA cria condições termodinamicamente favoráveis para a adesão bacteriana a superfícies hidrofóbicas (Das et al.²⁸, 2010; Ciardi et al.²⁴, 1977).

O eDNA também ajuda na construção e estabilidade mecânica da MEC, pois estas moléculas formam estruturas bem organizadas de aparência semelhantes à organização dos EPS (Whitchurch et al.¹⁷¹, 2002; Petersen et al.¹²⁶, 2005). Aliás, estes dois compostos interagem entre si e quando estão em pH ácido aumentam a adesão e fortalecem a estruturas do biofilme de *Myxococcus xanthus* (Hu et al.⁶⁵, 2012). Isto é relevante pois dentro da MEC de biofilmes cariogênicos os nichos são altamente ácidos com valores de pH no intervalo de 4,5 – 5,5 (Guo et al.⁴⁷, 2013; Xiao et al.¹⁷⁶, 2012).

A autólise pode ser uma forma de morte celular programada utilizada por certas bactérias como um comportamento altruísta para o desenvolvimento, adesão, maturação e dispersão do biofilme, aumentando a sobrevivência de populações de microrganismos (Bayles¹², 2007; Allesen-Holm et al.⁷, 2006; Steinberger, Holden¹⁵³, 2005). O processo autolítico afeta a composição da parede celular, que é uma estrutura dinâmica e complexa que se expande (quando as células crescem) e é remodelada (na divisão celular) (Ahn et al.^{4, 5}, 2010; 2016). Os operons *cidAB* e *lrgAB* codificam proteínas associadas à membrana CidA, CidB, LrgA e LrgB, relacionadas com características de virulência como: resposta ao estresse oxidativo, autólise e desenvolvimento de biofilme (Ahn et al.^{4, 5}, 2010; 2016). Operon é o nome dado para sequências genéticas que se encontram contíguas e são reguladas de uma forma coordenada. As proteínas LrgA/B de *S. mutans* compartilham características estruturais com a família de proteínas *holin* do bacteriófago lambda, associadas à autólise (Ahn et al.^{4, 3}, 2010; 2012).

Para permitir que os microrganismos sintam e respondam às mudanças nas condições ambientais, existem mecanismos de acoplamento estímulo-resposta básicos chamados: sistema regulador de dois componentes ou TCS (do inglês *Two*

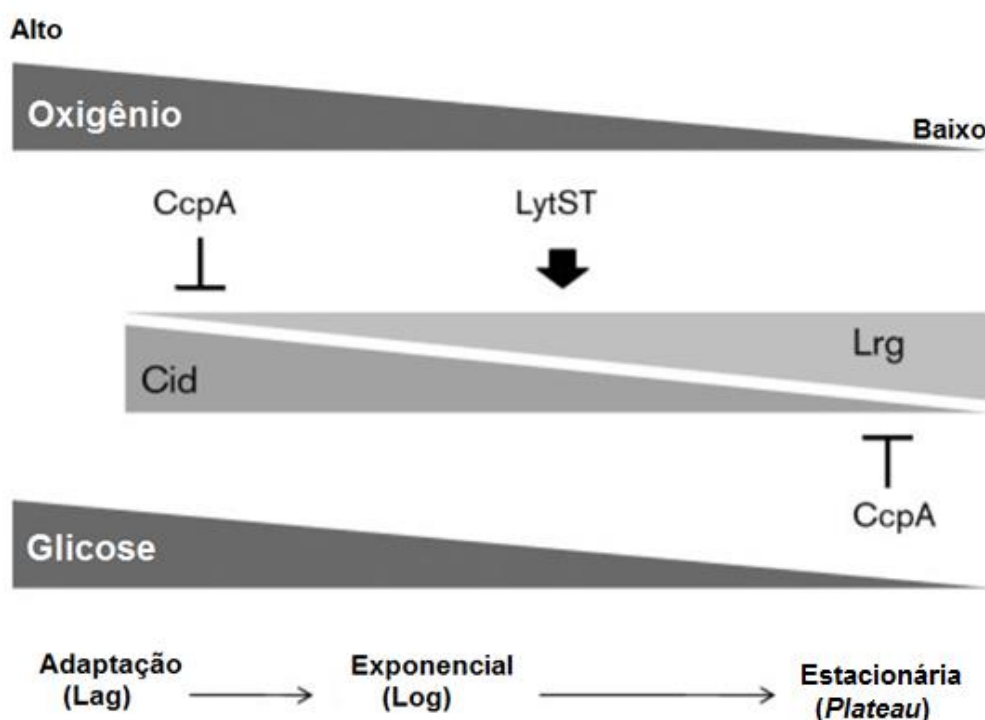
Component System). As proteínas LrgA/B são reguladas pelo TCS LytST (do inglês *Signal-Transduction complex*, previamente conhecido como LytSR), e são influenciadas por condições externas como oxigenação e os níveis de glicose (Ahn et al.^{4, 3}, 2010; 2012). Quando as células entram na fase estacionária de crescimento ou ocorre limitação de oxigênio/glicose, os genes *lrgAB* são ativados através do TCS LytST, enquanto a expressão de *cidAB* (outros genes responsáveis por autólise) diminui nestas condições (Ahn et al.^{4, 3, 5}, 2010; 2012; 2016).

A proteína de controle catabólico ou CcpA (do inglês *catabolite control protein*) tem como função ativar ou reprimir a expressão de determinados genes como resposta às fontes e à disponibilidade de carboidratos. Os genes regulados por CcpA incluem os que codificam enzimas envolvidas no ciclo glicolítico, no ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarboxílico), em vias catabólicas, nos sistemas transportadores de carboidratos e produção de reservas de polissacarídeos intracelulares (Abranches et al.², 2008; Smith, Spatafora¹⁴⁸, 2012). Dado que a expressão *cidAB* e *lrgAB* é altamente sensível aos níveis de glicose e oxigênio em *S. mutans*, tem se teorizado que CcpA pode regular estes genes, porém não está claro se é uma regulação direta que tenha um vínculo com a produção de eDNA, ou se é um resultado indireto de expressão alterada de outros genes reguladores, ou se é devido a um efeito sobre o metabolismo da glicose, conforme modelo proposto para mostrar a interação dos 7 genes (Figura 4) (Ahn et al.⁴, 2010; Smith, Spatafora¹⁴⁸, 2012).

Biofilmes crescidos na presença de sacarose e amido e posteriormente tratados com DNase I mostraram diminuição na biomassa e no acúmulo do biofilme, o que demonstra a importância estrutural do eDNA para o estabelecimento e integridade da MEC em biofilmes de *S. mutans* (Klein et al.⁷⁷, 2010). Os efeitos combinados de amido e de sacarose influenciam a liberação de eDNA na MEC, o que pode ser devido à indução da expressão dos genes *lytST* durante a formação de biofilme por *S. mutans*; da mesma forma, o gene *ccpA* que é regulado através da disponibilidade de carboidratos apresentou uma expressão elevada neste modelo (Klein et al.⁷⁷, 2010). Nesses mesmos biofilmes observou-se a síntese de glucanos insolúveis aumentada (representada pela elevação da expressão de *gtfB*), o que poderia resultar numa interação entre eDNA e Gtfs podendo explicar a formação de um biofilme com uma MEC mais espessa e altamente coesiva que facilita o acúmulo de bactéria cariogênica *S. mutans* (Klein et al.^{77, 78}, 2010; 2009; Liao et al.⁹⁰, 2014).

As quantidades de eDNA disponíveis na porção solúvel em água da MEC de biofilmes da cepa parental de *S. mutans* UA159 foram maiores ao serem comparadas com uma cepa $\Delta gtfB$, isto leva a corroborar a interação entre GtfB e eDNA (Castillo²², 2016).

Figura 4 - Regulação dos sistemas Cid/Lrg de *S. mutans* influenciados por disponibilidade de recursos (oxigênio e glicose)



A regulação dos sistemas Cid/Lrg de *S. mutans* é influenciada pela disponibilidade de recursos (oxigênio e glicose) durante o crescimento planctônico. Quando há altos níveis de oxigênio e glicose disponíveis a expressão de *cid* é dominante, mas *lrg* é mínima. Ao entrar na fase estacionária (limitação de glicose e oxigênio) ocorre aumento da expressão de *lrg* pela influência do TCS LytST comcomitante à diminuição da expressão de *cid* (devido à regulação via CcpA). Os níveis de expressão de *lrg* e de *cid* estão diretamente relacionados à formação de biofilme.

Fonte: Adaptado de Ahn et al.⁴, 2010

2.3.3 Ácidos lipoteicóicos (LTA)

A parede de bactérias Gram positivas é essencial para a sobrevivência, manutenção da forma e a integridade das células. A parede está organizada como uma rede reticulada e multifacetada de macromoleculares de peptidoglicanos (mureína), ácidos teicóico polianiónicos (TAs) e proteínas de superfície (Neuhaus,

Baddiley¹¹¹, 2003). TAs têm um impacto sobre processos biológicos importantes: autólise, ligação catiônicas e proteínas de superfície associadas à adesão, co-agregação, formação de biofilme, resistência a agentes antimicrobianos, tolerância do ácido, secreção de proteínas, virulência e estimulação da resposta imune (Kovács et al.⁸³, 2006; Götz⁴², 2002; Gross et al.⁴⁵, 2001; Spatafora et al.^{152, 153}, 1995; 1999). O grau de D-alanilação de TAs nesses processos tem mostrado grande importância (Kovács et al.⁸³, 2006; Götz⁴², 2002; Gross et al.⁴⁵, 2001; Spatafora et al.^{152, 153}, 1995; 1999).

TAs podem se ligar covalentemente à peptidoglicanos da parede e são chamados ácido teicóicos da parede ou WTA (do inglês *wall teichoic acids*) ou podem se ancorar na membrana citoplasmática como ácidos lipoteicóicos ou LTA (do inglês *lipoteichoic acids*) (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003). Assim, LTA são polímeros de moléculas anfifílicas de poli-ol-fosfatos, que estão ancoradas na membrana celular por um glicolípido e sua cadeia poli (glicerofosfato) (GRO-P) que se estende para a parede celular, por isto é considerado um componente do envelope de bactérias Gram-positivas (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003; Kovács et al.⁸³, 2006).

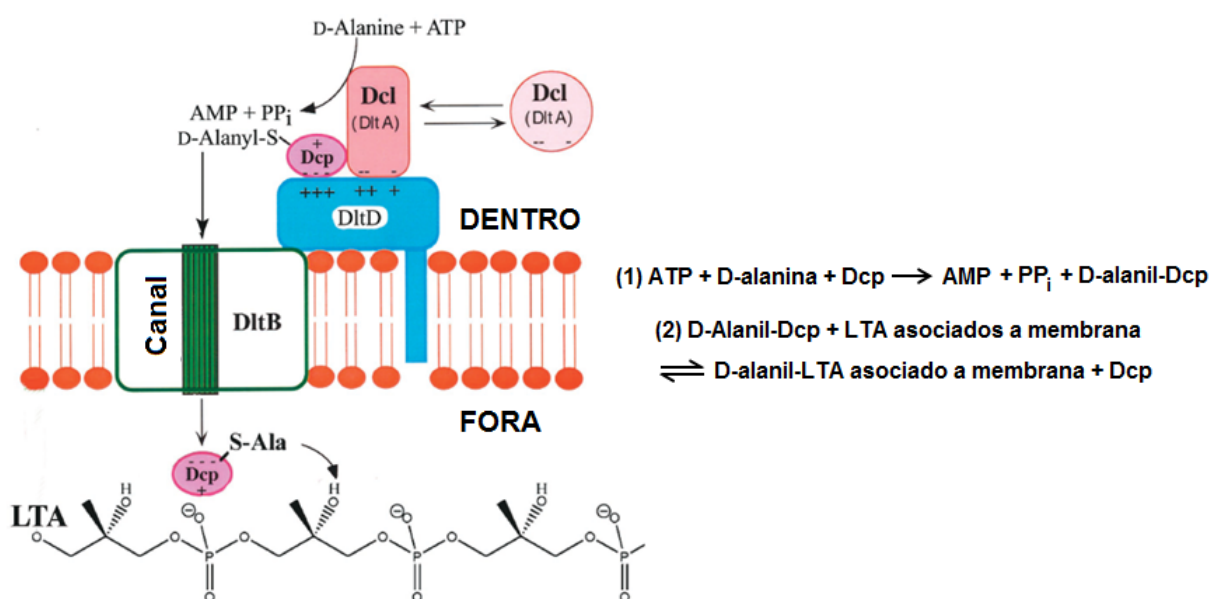
LTA pode ser liberado para o ambiente extracelular, especialmente durante a remodelagem da parede celular (Brock, Reiter¹⁹, 1976; Ellwood, Tempest³³, 1972) e também autólise. O mecanismo de síntese de LTA foi descrito para algumas espécies, mas não para *S. mutans* (Reichmann, Gründling¹³⁰, 2011; Denapate et al.²⁹, 2012; Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003). *Staphylococcus aureus* sintetiza o ácido lipoteicóico poliglicerol-fosfato (LTA) a partir de fosfatidilglicerol utilizando a proteína LtaS (LTA sintetase) (Gründling, Schneewind⁴⁶, 2007), *S. mutans* apresenta um gene (SMU_775c) que codificaria uma proteína hipotética, homologa à LtaS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=293739>; Klein et al.⁷⁹, 2015).

A síntese de D-alanil-LTA precisa de quatro proteínas que estão funcionalmente relacionadas que são codificadas pelo operon *dltABCD* (*D-alanil-LTA*) (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003). Os componentes desse operon são os genes que codificam: a proteína transportadora de ligase D-alanina-D-alanil ou Dcl (em inglês *D-alanyl carrier protein ligase*) e a proteína transportadora de D-alanil ou Dcp (em inglês *D-alanyl carrier protein*) (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003). Dcl é codificada pelo gene *dltA*. Dcp é codificada pelo gene *dltC*, além do gene *dltB* codificar uma

proteína de transporte e o gene *dltD* codifica uma proteína de membrana que assegura a ligação de D-alanina com Dcp (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003).

O processo de incorporação de D-alanina à membrana é realizado numa reação com duas etapas (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003). Na primeira etapa devem estar presentes trifosfato de adenosina (ou ATP) + D-alanina + Dcp, e essa interação é mediada por Dcl e resultará na ligação D-alanina-Dcp (o resíduo metabólico é um pirofosfato e um monosfato de adenosina) (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003). A segunda etapa, requer D-alanina-Dcp (são ligados a membrana pela *dltD*) e LTA associado a membrana, os quais serão secretados através do canal de transporte (fornecido pela proteína *DltB*) para o periplasma onde a D-alanilização ocorre (Figura 5) (Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003).

Figura 5 - Modelo de incorporação de D-alanina à membrana associada com LTA



Incorporação da D-alanina ao LTA associado à membrana ocorre em duas etapas. Primeiro o Dcl (*dltA*) utilizando ATP liga a D-alanina ao Dcp (*dltC*). Segundo a proteína de membrana DltD proporciona sítios de ligação para Dcp e Dcl na região interna do citoplasma. DltB proporciona um canal para a secreção de D-alanyl-Dcp para o periplasma onde D-alanilização ocorre e passarão a formar parte da parede celular.

Fonte: Adaptado de Neuhaus, Baddiley¹¹¹, 2003

2.4 Microrganismos e Genes de Interesse Envolvidos no Desenvolvimento da Cárie

Por ter diversas características de virulência para o desenvolvimento da cárie, *S. mutans* é o principal microrganismo de interesse. Na presença de sacarose, ele aumenta a capacidade de colonizar a película adquirida mediante o uso de Gtfs e Ftfs (Fu, Robyt⁴¹, 1991; Bowen, Koo¹⁶, 2011). Outros microrganismos também são ávidos colonizadores iniciais e predominam nos primeiros estágios de desenvolvimento do biofilme, no modelo ecológico da placa bacteriana (Marsh⁹⁷, 1994). Entre os colonizadores iniciais estão representantes do grupo dos estreptococos (por exemplo, *Streptococcus gordonii*) e um do grupo não estreptococos (por exemplo, *Actinomyces naeslundii*).

As bactérias do gênero *Streptococcus* representam entre 10 a 20% das bactérias encontradas na cavidade oral, mas elas compreendem entre 60 a 80% da população total de bactérias nas superfícies dentárias durante as primeiras 24 h após a limpeza dos dentes (colonizadores iniciais) (Rickard et al.¹³², 2003). Assim, essas espécies têm um papel chave na mediação das interações da placa dentária, pois usualmente são produtoras de adesinas, que são receptores associados à adesão das bactérias à película salivar (Nyvad, Kilian¹¹⁷, 1990; Jakubovics, et al.⁷⁰, 2008; Zhang, Senpuku¹⁷⁹, 2013). As proteínas ricas em prolina, as Gtfs e α -amilase presentes na saliva e na película salivar adquirida têm afinidade com a superfície de *S. gordonii*, ajudando na adesão dessa espécie à hidroxiapatita e consequente na formação do biofilme (Vacca-smith et al.¹⁶⁵, 1996; Tanzer et al.¹⁵⁸, 2012; Scannapieco et al.¹⁴², 1993; Rogers et al.¹³⁵, 2001).

A α -amilase é a enzima salivar mais abundante nos seres humanos. Esta enzima hidrolisa o amido proveniente da dieta deixando como principais subprodutos glucose, maltose e maltodextrinas (Rogers et al.¹³⁵, 2001; Klein et al.⁷⁷, 2010). Estes hidrolisados são substratos fermentáveis para muitas espécies de bactérias orais e funcionam como aceptores de elétrons durante a síntese de glucanos feita pelas Gtfs de *S. mutans* (Rogers et al.¹³⁵, 2001; Bowen, Koo¹⁶, 2011).

O gênero *Actinomyces* constitui aproximadamente um terço das espécies não do gênero *Streptococcus* de biofilmes iniciais. *Actinomyces* spp. aderem-se às superfícies dos dentes nas primeiras 4 h, mas sua proporção no biofilme só aumenta após 8-12 h, possivelmente devido a um longo tempo de duplicação (Nyvad,

Kilian¹¹⁶, 1987; Jakubovics et al.⁷⁰, 2008). As espécies de *Actinomyces* muitas vezes encontram-se sobrepostas às espécies de *Streptococcus* e são ambas as espécies que iniciam a colonização da superfície do dente, frequentemente se coagregando uns com os outros até incrementando a adesão interbacteriana, o que leva ao desenvolvimento do biofilme (Palmer et al.¹²¹, 2003; Jakubovics et al.⁷⁰, 2008; Zhang, Senpuku¹⁷⁹, 2013). Além disso, a presença de *A. naeslundii* está relacionada com o desenvolvimento da doença periodontal e da cárie radicular (afetando o cimento dental). Acredita-se que na presença de sacarose essa espécie possa contribuir com a acidez do biofilme, convertendo-se em um patógeno da cárie (Jordan, Keyes⁷¹, 1964; Socransky et al.¹⁵⁰, 1970; Miller¹⁰⁶, 1974).

S. mutans é considerado cariogênico por sua acidogenicidade e aciduricidade, porém é a produção de EPS para formação da MEC o que diferencia esse microrganismo das outras espécies. *S. mutans* contribui tanto na construção da estrutura da MEC quanto na estabilidade do biofilme ao aportar também LTA e eDNA (Klein et al.⁷⁹, 2015; Kuramitsu et al.⁸⁶, 1980; Chiu, Baker²³, 1994; Castillo²², 2016). Por isso, são de interesse avaliar a expressão dos genes (Tabela 1) associados com:

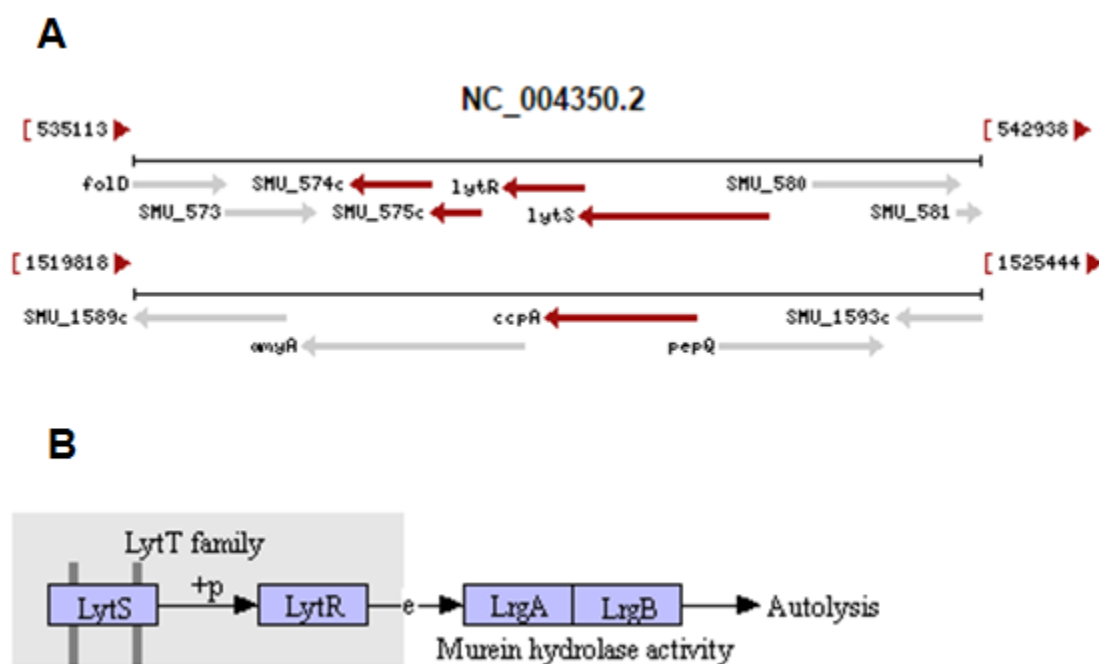
- (i) eDNA, incluindo o operon *lrgAB*, que é ativado pelo sistema de dois componentes *lytST*, e o gene regulador *ccpA* que responde à disponibilidade de carboidratos, mas o qual ainda não se sabe se tem um vínculo direto com a produção de eDNA (Figura 6);
- (ii) o metabolismo de LTA, incluído a síntese de D-alanina-LTA via operon *dltABCD* e a proteína hipotética *SMU_775c* (Figura 7);
- (iii) o metabolismo de EPS da MEC, especificamente a síntese de exopolissacarídeos codificada pelos genes *gtfBCD*, organização estrutural e espacial de EPS via ligação dos glucanos por enzima codificada pelo gene *gbpB* e remodelação via expressão de *dexA* (Figura 8).

Tabela 1- Genes selecionados para o estudo

Associados com	Gene	Proteína	Função
EPS	<i>gtfB, gtfC, gtfD</i>	Glucosiltransferases B, C e D	Síntese de EPS ¹⁶
	<i>gbpB</i>	Proteína de ligação de glucanos	Configuração 3D de EPS ¹⁰³
	<i>dexA</i>	Dextranase A	Remodelação de EPS ⁵⁹
eDNA	<i>lrgAB</i>	Proteínas associada a membrana LrgA/B	Autólise ⁴
	<i>lytST</i>	Sensor de estímulo / resposta TCS LytT/S	Regulador de transcrição ³
	<i>ccpA</i>	Proteína de controle catabólico	Regulador de transcrição ⁵
LTA	<i>dltABCD</i>	Proteínas Dcl, DltB, Dcp, DltD	D-alanização de LTA ¹¹¹
	<i>SMU_775c</i>	Proteína hipotética	Semelhante com á enzima sintetase de LTA de <i>S. aureus</i> ⁷⁹

Fonte: Elaboração própria.

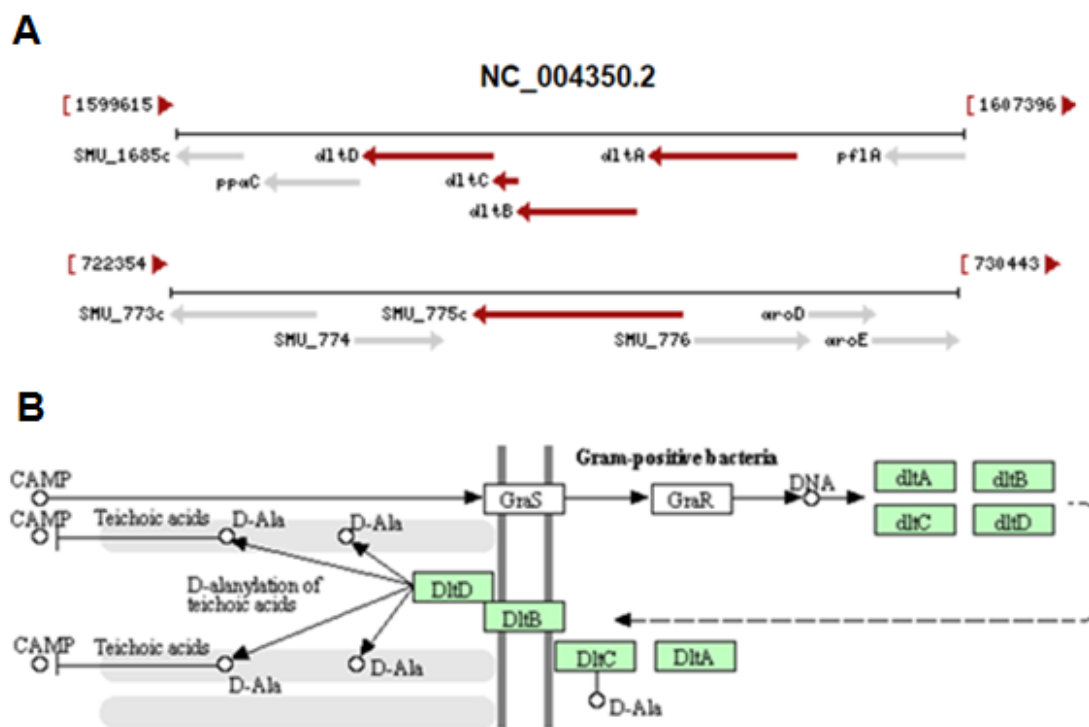
Figura 6 - Localização dos genes relacionados com eDNA no genoma de *S. mutans* UA159 (A) e a via metabólica na que estão envolvidos (B)



Localização dos genes *lytST*, *lrgAB* e *ccpA* no genoma de *S. mutans* UA159 (A), as setas em vermelho mostram os genes nomeados e a direção em que eles são transcritos. Localização das proteínas sintetizadas por estes genes dentro da via metabólica (B), a autólise está associada com LrgA/B e a sua vez eles são regulados pelo TCS LytST.

Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

Figura 7 - Localização dos genes relacionados com LTA no genoma de *S. mutans* UA159 (A) e a via metabólica relacionada com o processo de D-alanização (B)

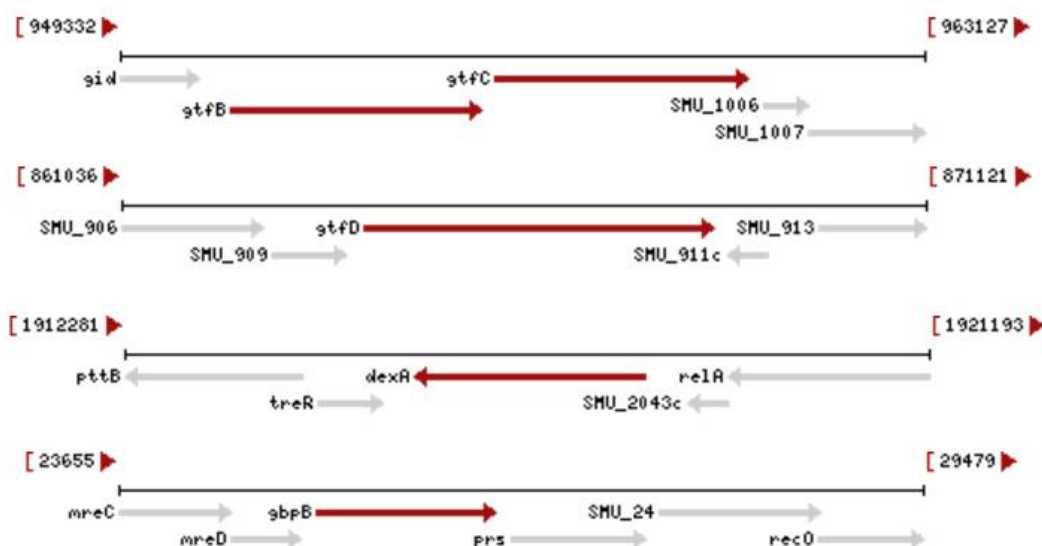


Localização do operon *dltABCD* e do gene *SMU_777c* no genoma de *S. mutans* UA159(A), as setas mostram em vermelho os genes nomeados e a direção em que eles são transcritos, no caso do operon se observa a sobreposição dos genes. Localização das proteínas sintetizadas por estes genes dentro da via metabólica (B), na parte superior direita estão os genes transcritos em bloco (sinalizados em cor verde), na parte inferior indicada pela seta pontilhada estão as proteínas localizadas na membrana celular e posterior relacionamento com a D-alanização dos ácidos teicóicos. A via metabólica da proteína hipotética *SMU_577c* associada com LTA ainda não foi descrita.

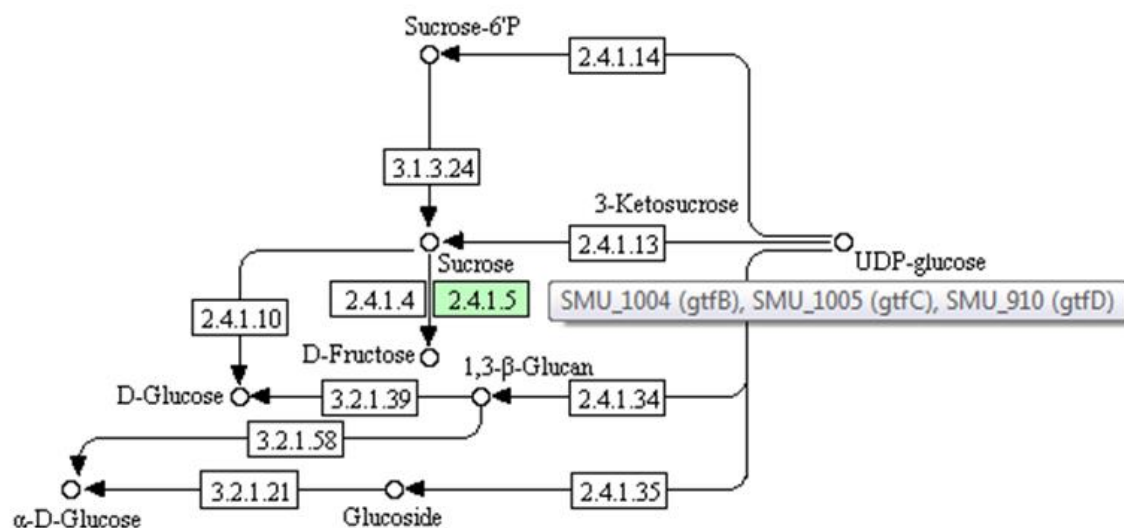
Fonte: NCBI e KEGG.

Figura 8 - Localização dos genes relacionados com a síntese, estruturação e remodelação de EPS no genoma de *S. mutans* UA159 (A) e a sua função na via metabólica do amido e da sacarose (B)

A



B

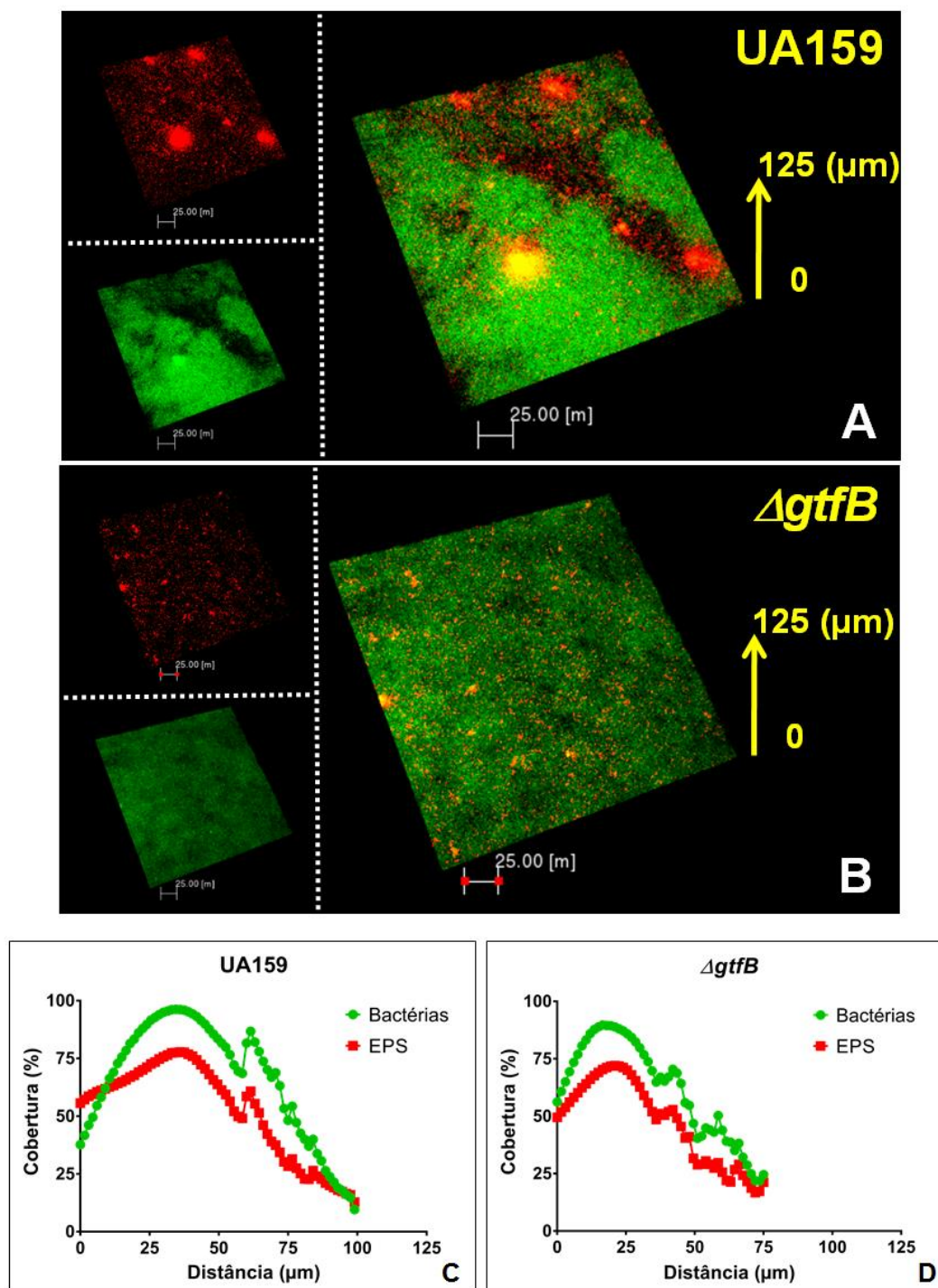


Localização dos genes *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpB* e *dexA* no genoma de *S. mutans* UA159 (A), as setas em vermelho mostram os genes nomeados e a direção em que eles são transcritos. Localização das proteínas sintetizadas por estes genes na via metabólica (B): todas as proteínas são mostradas no mesmo estágio do metabolismo de sacarose e amido (representado pelo quadro verde), estando relacionado com a transformação de sacarose para D-frutose.

Fonte: NCBI e KEGG.

Biofilmes mistos formados na presença de sacarose e amido contendo as cepas *S. gordonii* DL-1, *A. naeslundii* ATCC 12104 e *S. mutans* UA159 são acidogênicos, já que todos estes microrganismos produzem glucanos e frutanos que contribuem na construção da MEC são acidogênicos (Klein et al.⁸¹, 2012; Xiao et al.¹⁷⁶, 2012, Bergeron et al.¹⁴, 2000; Haisman, Jenkinson⁵⁰, 1991). Ainda, as três cepas podem produzir eDNA e LTA (Melvaer et al.¹⁰⁴, 1974; Hardy et al.⁵³, 1981; Hogg et al.⁶², 1997; Kreth et al.⁸⁵, 2009), mas o impacto exato de cada espécie durante a construção da MEC está sendo estudado, embora *S. mutans* seja principal patógeno sob condições cariogênicas (Bowen, Koo¹⁶, 2011, Koo, et al.⁸², 2013). Em achados recentes observou-se que retirar o gene *gtfB* pode diminuir as quantidades de alguns componentes considerados fundamentais na construção da MEC em biofilmes (monoespécie e mistos contendo *S. mutans*) como proteínas, eDNA e EPS (Castillo²², 2016). Sobretudo, as imagens de microscopia confocal evidenciam que os biofilmes formados pela cepa $\Delta gtfB$ têm uma configuração 3D limitada, carecem de microcolônias definidas e apresentam diferentes distribuições de bactérias e de EPS (vs. cepa parental; Figura 9) (Koo et al.⁸², 2010; Xiao et al.¹⁷⁶, 2012; Castillo²², 2016). Portanto, a investigação de como a matriz extracelular afeta a expressão gênica de *S. mutans* em biofilme cariogênico poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de terapias direcionadas a fatores que possam diminuir a cariogenicidade.

Figura 9 - Arquitetura 3D e distribuição dos principais componentes de biofilmes mistos formados por *S. mutans* cepa parental UA159 e cepa mutante $\Delta gtfB$. (Continua)



A e B mostram imagens representativas de renderização via software AMIRA. C e D ilustram a distribuição do conteúdo de bactérias e EPS nos biofilmes desde o substrato (discos de hidroxiapatita) até o topo via software COMSTAT2. Os biofilmes mistos com 115 h foram analisados por microscopia confocal. Em verde são bactérias marcadas com SYTO9, e em

Figura 9 - Arquitetura 3D e distribuição dos principais componentes de biofilmes mistos formados por *S. mutans* cepa parental UA159 e cepa mutante $\Delta gtfB$.
(Conclusão)

vermelho são EPS marcados com AlexaFluor 674. Assim, para marcação da matriz EPS foi usado um método baseado na incorporação de 1 μ M de dextranos conjugados com Alexa Fluor® 647 (647/668 nm; Molecular Probes, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) pelas enzimas Gtfs durante a formação de exopolissacarídeos (Klein et al.⁷⁸⁰, 2009). Esse fluoróforo foi adicionado ao meio de cultura a partir do início da formação dos biofilmes e a cada troca de meio de cultura durante o desenvolvimento dos biofilmes. Para marcar as bactérias nos biofilmes, em 115h de formação, os biofilmes foram retirados do meio de cultura, enxaguados com NaCl 0,89%, e transferidos para poços contendo de 2.5 μ M de fluoróforo SYTO®9 (485/498 nm; Molecular Probes) em NaCl 0,89%. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, os biofilmes foram enxaguados três vezes utilizando NaCl 0,89%, e deixados nesta mesma solução a temperatura de 4°C até a realização de análises microscópicas. O SYTO® 9 foi utilizado. A aquisição das imagens foi realizada utilizando um microscópio Zeiss LSM 780 (Zeiss, Alemanha) equipado com uma lente objetiva de 20X. Cada biofilme foi examinado em 2 posições selecionadas aleatoriamente, e uma série de imagens confocais foram gerados por corte óptico em cada uma destas posições. As imagens foram analisadas usando o software AMIRA 6.0.1 (Mercury Computer Systems Inc., Chelmsford, MS), para a visualização simultânea de EPS e células bacterianas dentro dos biofilmes intactos. Com esse software foram geradas representações tridimensionais de cada componente estrutural (EPS e bactérias) dos biofilmes para a visualização da morfologia e arquitetura 3D (Klein et al.⁷⁸, 2009) (imagens em A e B). Ainda, o programa COMSTAT2 foi utilizado para quantificação da distribuição de bactérias e de EPS por camada, desde o substrato (disco SHA - 0 μ m) até o topo de cada biofilme, na estrutura 3D do biofilme (imagens gráficas em C e D).

Fonte: Elaboração própria.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a dinâmica de expressão dos genes de *S. mutans* associados com LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), eDNA (*lytST*, *lrgAB*, *ccpA*) e exopolissacarídeos (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*) durante o desenvolvimento da MEC em biofilmes cariogênicos mistos formados pelas cepas de *S. mutans* UA159 (parental) e $\Delta gtfB$ (mutante em que o gene *gtfB* foi deletado).

4 MATERIAL E MÉTODO

Para determinar a dinâmica de expressão dos genes de *S. mutans* associados com o metabolismo de eDNA (*lytST*, *lrgAB*, *ccpA*), de LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), e de exopolissacarídeos (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*) durante o desenvolvimento da MEC em biofilme cariogênico foi necessário realizar as seguintes etapas: 1) Delineamento e padronização de *primers* específicos para os genes de interesse (quando não previamente disponíveis na literatura); 2) Formação de biofilmes mistos; 3) Isolamento do RNA, síntese de cDNA e análise da expressão gênica dos genes selecionados via PCR quantitativo (qPCR).

4.1 Delineamento e Padronização de *Primers*

Foram delineados e padronizados *primers* para análise de expressão dos genes de *S. mutans* associados com ácidos lipoteicóicos (*dltABCD*, *SMU_775c*) e eDNA (*lytS*, *lrgAB*). Para os genes *lytT* (*SMU_576c*, formalmente conhecido como *lytR*), *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpB*, *dexA*, *ccpA* já existem pares de *primers* padronizados^{77, 81, 176} (Tabela 2).

4.1.1 Delineamento

Os genes de interesse foram procurados na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Então, as sequências em formato FASTA de cada gene foram copiadas para verificar sua homologia contra outros genes da mesma espécie e contra outras espécies, especialmente àquelas que estariam presentes no modelo de biofilme cariogênico misto. As sequências avaliadas foram: *dltA* (*SMU_1691*), *dltB* (*SMU_1690*), *dltC* (*SMU_1689*), *dltD* (*SMU_1688*) e *SMU_775c*, *lytS* (*SMU_577c*), *lrgA* (*SMU_575c*), e *lrgB* (*SMU_574c*).

Para a verificação da homologia foi utilizada a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (*BLASTn* para nucleotídeos) do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Como as três espécies do biofilme misto a ser estudado já estavam determinadas (*S. mutans*, *S. gordonii*, *A. naeslundii*), procurou-se entre os resultados de *BLASTn* se existia similaridade dos genes de *S. mutans* com os outros dois microrganismos. Quando uma sequência FASTA era homóloga para genes de outras espécies que não fossem *S. mutans*, a sequência

FASTA completa de cada gene foi procurada no NCBI, copiada e utilizada para realizar o alinhamento múltiplo no software Clustal Omega disponibilizado por *The European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Com esse alinhamento das sequências dos genes foram observadas e selecionadas as regiões que apresentavam ausência de pareamento, ou menor pareamento entre as bases das espécies diferentes.

Tabela 2 - *Primers* já padronizados que foram utilizados para realização de qPCR

GenBank Locus Tag	Nome do Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (Sense e Antisense)	Concentração ótima para qPCR (nM)	Referências
	16S rRNA	ACCAGAAAGGGACGGCTAAC TAGCCTTTTACTCCAGACTTTCCTG	200	
SMU_1004	<i>gtfB</i>	AAACAACCGAAGCTGATAC CAATTTCTTTTACATTGGGAAG	250	Xiao et al. ¹⁷⁶ , 2012
SMU_1005	<i>gtfC</i>	CTCTGACTGCTACTGATACAAG CCGAAGTTGTTGTTGGTTTAAC	250	
SMU_910	<i>gtfD</i>	AGCACAACTTCTGAAGAGC CAGCTTTTGCCTGTGTAAAG	250	
SMU_2042 c	<i>dexA</i>	TATTTTAGAGCAGGGCAATCG AACCTCCAATAGCAGCATAAC	250	
SMU_22	<i>gbpB</i>	ATACGATTCAAGGACAAGTAAG TGACCCAAAGTAGCAGAC	250	Klein et al. ⁸¹ , 2012
SMU_576	<i>lytT</i>	TGGCAAGACAAGAGTTAA GCTAATATCTTCAGCTTCAA	250	Klein et al. ⁷⁷ , 2010
SMU_1591	<i>ccpA</i>	ATTGACCGTCTTGATTATC AGCATTAGCAATATTAGGG	250	Klein MI.

Fonte: Dados retirados de Klein et al.⁷⁷, 2010; Klein et al.⁸¹, 2012; Xiao et al.¹⁷⁶, 2012.

Os fragmentos escolhidos (entre 700 e 800 pares de bases) de cada gene de interesse foram analisados para verificar a ocorrência de estruturas secundárias, utilizando o software Mfold (disponibilizado por *The ARN Institute*, <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) com as seguintes especificações: 60°C, Na⁺ 50 mM, Mg⁺⁺ 3 mM. Após a análise com esse software, se selecionaram sequências com tamanho entre 250-300 pares de bases (pb) que estivessem livres de estruturas secundárias (e.g. *hairpins*).

As sequências selecionadas foram inseridas no software Beacon Designer 8.13. Neste software, foi realizada análise com ferramenta BLASTn novamente e um par de *primers* (sense e antisense) foi desenhado para cada gene, usando a opção SYBR e os parâmetros Tm 55 ± 5 °C (*Anneling temperature*), tamanho de sequência de oligonucleotídeo 18 a 20 pares de bases, tamanho do *amplicon* (i.e., produto de PCR) de 90 até 200 pb.

Dentre as opções de pares de *primers* disponibilizadas pelo software, escolheram-se os *primers* que apresentavam uma porcentagem de GC em torno 40 e com o valor de Tm próximo a 55 °C. Em seguida, analisou-se as sequências dos produtos a serem amplificados para descartar homologia e estruturas secundárias. Finalmente, as sequências dos pares de *primers* selecionados (Tabela 3) que atenderam aos critérios utilizados para seu delineamento, foram enviadas para a síntese dos oligonucleotídeos (Thermo Fisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>; Custom.br@lifetech.com).

Cada primer sintetizado foi diluído com tampão TE (Tris 10mM e EDTA 1mM; pH 8.0) para obtenção de solução estoque a 100 µM, alíquotas dessas soluções foram quantificadas via nanoespectrofotometro (260 nm) para confirmação das concentrações. Para preparar soluções de trabalho a 10 µM foram misturados 100 µL de *primer* sense e 100 µL de *primer* antisense com 800 µL de água de grau molecular (Invitrogen; água destilada ultrapura, livre de DNase e RNase).

4.1.2 Padronização

Os *primers* sintetizados foram testados utilizando-se PCR convencional contra um painel de DNA genômico de microrganismos, incluindo *S. mutans* e as outras espécies do biofilme misto a ser estudado, para verificar o tamanho do produto e se existe a amplificação de produto de PCR em outras espécies que não sejam a espécie de interesse *S. mutans* (i.e., reação cruzada). Em seguida, foram

confeccionadas curvas padrão com produtos de PCR específicos para cada gene, e a concentração ótima de cada *primer* foi determinada via reações de qPCR.

Tabela 3 - *Primers* para realização de qPCR desenhados neste estudo

GenBank Locus Tag	Nome do Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (sense e antisense)
SMU_1691	<i>dltA</i>	AGTTATTGCTGTTGATGA CCCTGAAGTAAAGATGATA
SMU_1690	<i>dltB</i>	TGTCTTCATGTCTATCTTAC TTCCATAATCATACCTACTG
SMU_1689	<i>dltC</i>	TATCACTGTTCCCTGTTTC TAAGCATTTTCGTAACCTCC
SMU_1688	<i>dltD</i>	GCTTTATCACCTAGTAGTT GATTATAACGCTCTGCTA
SMU_575c	<i>lrgA</i>	GTCTATCTATGCTGCTATT AAGGACATACATGAGAAC
SMU_574c	<i>lrgB</i>	GTAAAGGCTTCTTTCTCT TAACATCAGTTCCCAATC
SMU_577c	<i>lytS</i>	TTCAGAGACTTGGTATTATC TTGGAAATGATGACGAAA
SMU_775c	-	TTTGCTATTTCTGCTCTC TGTGTTTGGTAAGTTTGA

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2.1 Isolamento de DNA genômico para testar os *primers*

Para esta etapa, foram geradas as curvas de crescimento para cinco microrganismos (Figura 10). Estoques armazenados em freezer -80°C das cepas *S. mutans* UA159, *S. gordonii* DL-1, *A. naeslundii* ATCC 12104, *Streptococcus oralis* ATCC 35037 e *C. albicans* SC5314 foram reativados em placas de ágar sangue (48 horas, 37 °C e 5% de CO₂). Realizou-se o pré-inóculo de cada cepa através da transferência de 5-10 colônias individuais para tubos distintos por cepa contendo 10

mL de meio líquido TYE (Tryptona + Extrato de levedura, Difco) + 1% de glicose (Synth), seguido de incubação (16-18hs, 37 °C e 5% de CO₂). Essas culturas foram diluídas 1:20 no mesmo meio de cultura fresco, e o crescimento dos microrganismos foi acompanhado longitudinalmente por leituras em espectrofotômetro (Biospectro), com comprimento de onda de 540 nm (determinação de densidade óptica ou D.O.). Ainda, diluições seriadas de cada cultura foram semeadas para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC).

Após a determinação das curvas de crescimento, esses microrganismos foram cultivados até a metade da fase logarítmica (quando os microrganismos estão no pico metabólico e pode se obter material genético mais integro) para o isolamento de DNA genômico. Cinco ml de cada cultura foram utilizados para obtenção de DNA genômico com o EPICENTER MasterPure™ complete DNA and RNA purification Kit, seguindo as instruções do fabricante, posteriormente à uma etapa de lise celular com lisozima e mutanolisina descrito por Klein et al.⁸⁰ (2012). Espectrofotometria foi utilizada para avaliar a quantidade (D.O.₂₆₀ nm) e a pureza (razão D.O. 260/280) das amostras de DNA (Nano-espectrofotômetro DS-11+, Denovix), o rendimento foi calculado dependendo do volume em que foi diluído o DNA, no caso foram utilizados 65 µL (Tabela 4). A integridade do material genético foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 1% (Ultra Pure™, Invitrogen; Figura 11). As amostras de DNA foram diluídas para 100 ng/µL.

Figura 10 - Curvas de crescimento e correlações entre D.O. e UFC/mL (Continua)

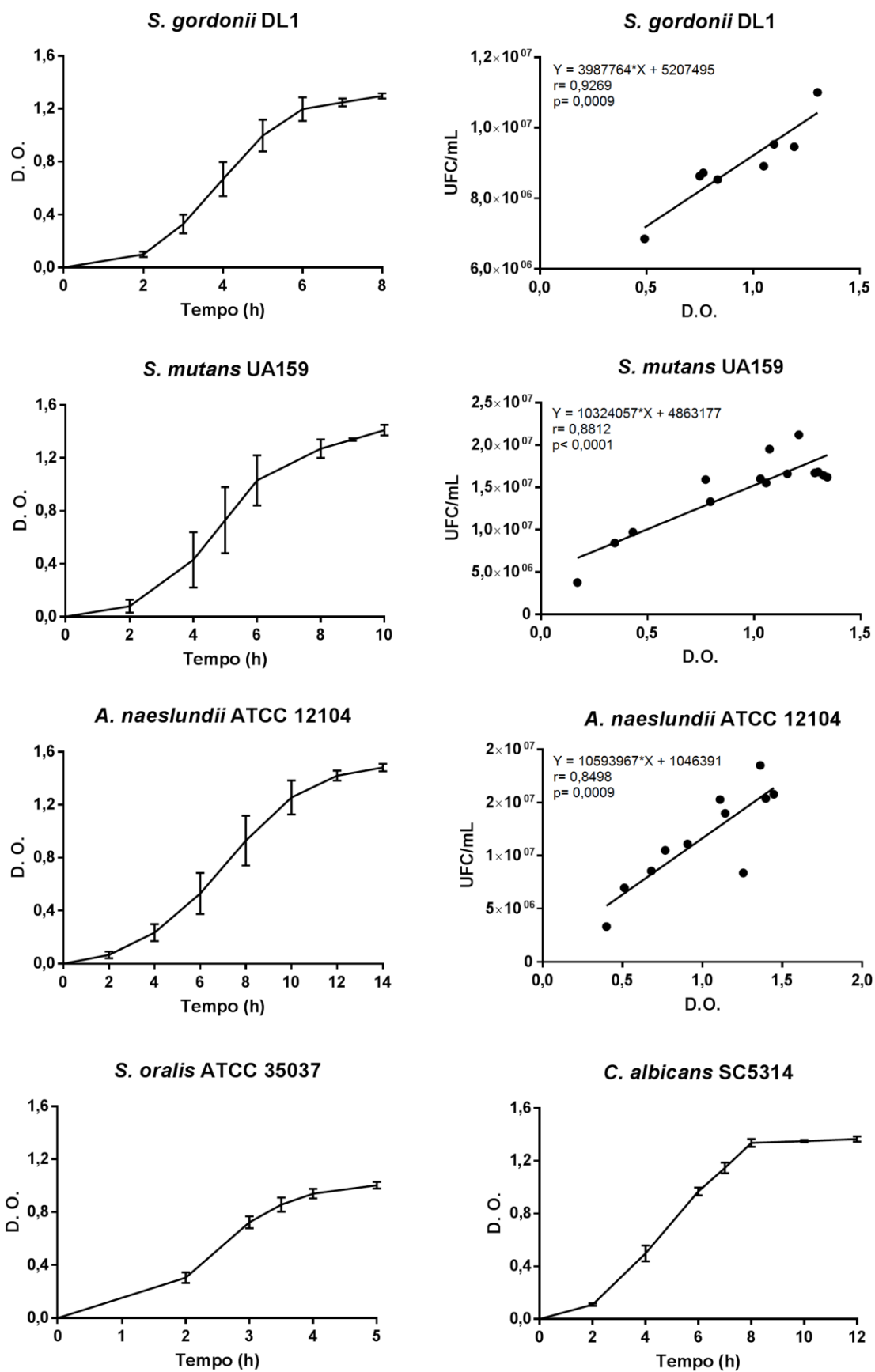


Figura 10 - Curvas de crescimento e correlações entre D.O. e UFC/mL (Conclusão)

Imagem geradas pelo software Prism 7 (GraphPad Software, Inc., 2016) com os dados obtidos de pelo menos dois experimentos, realizados em quadruplicata. Curvas de crescimento foram confeccionadas utilizando TYE + 1% de glicose como meio de cultura. Foi calculado até metade da fase logarítmica para cada uma das espécies: *S. gordonii* DL1 com D.O. 0,672 ($\pm 0,133$) e UFC/ml $8,07E+06$ ($\pm 2,57E+06$); *S. mutans* UA159 com D.O. 0,729 ($\pm 0,247$) e UFC, $1,37E+07$ ($\pm 6,16E+06$); *A. naeslundii* ATCC 12104 com DO 0,928 ($\pm 0,189$) e UFC $1,23E+07$ ($\pm 5,18E+06$); *S. oralis* ATCC 35037 com DO 0,724 ($\pm 0,046$) e UFC $4,34E+06$ ($\pm 1,36E+06$); *C. albicans* CS5314 com DO 0,967 ($\pm 0,034$) e UFC $1,96E+05$ ($\pm 3,63E+04$).

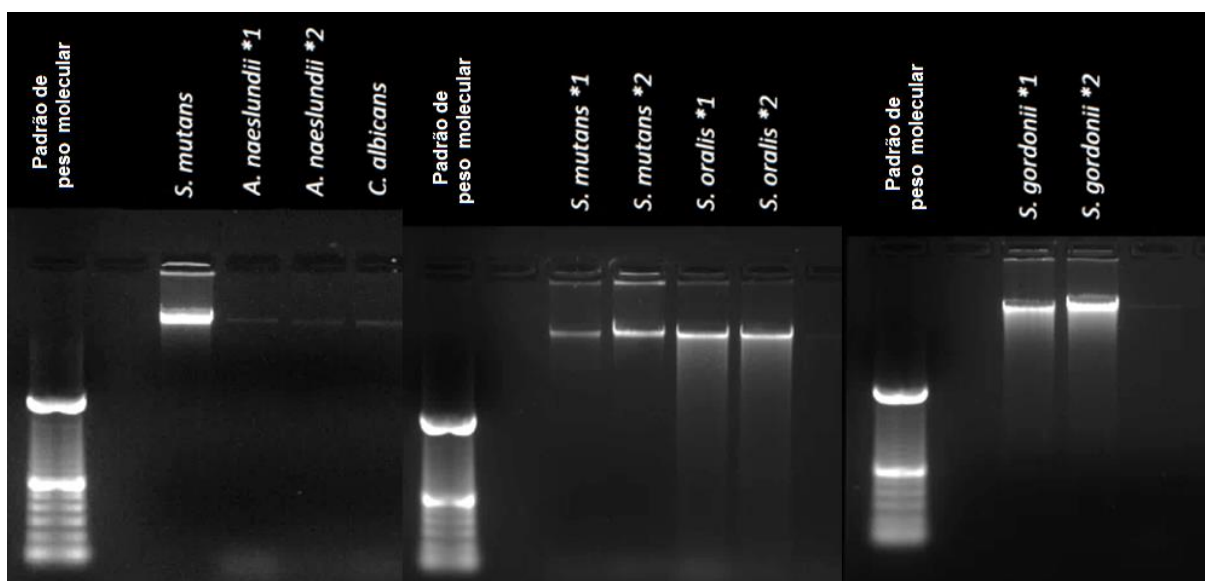
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Dados de DNA isolado de 5 espécies microbianas

Amostra	Concentração média de DNA (ng/ μ L)	Rendimento (μ g)	Razão 260/280
<i>S. gordonii</i> 1	4017,69	261,15	2,09
<i>S. gordonii</i> 2	410,415	26,68	2,04
<i>S. mutans</i> 1	3439,75	223,58	2,14
<i>S. mutans</i> 2	2976,01	193,44	2,00
<i>S. oralis</i> 1	3678,32	239,09	2,10
<i>S. oralis</i> 2	2017,7	131,15	2,06
<i>C. albicans</i>	2087,4	135,68	2,19
<i>A. naeslundii</i> 1	2382,81	154,88	1,92
<i>A. naeslundii</i> 2	2723,57	177,03	1,99

Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 - Eletroforese de amostras de DNA genômico de cinco espécies em gel 1% agarose



Eletroforese do DNA dos cinco microrganismos de interesse em gel de agarose 1% (1 µg/canaleta). Observa-se integridade do material genético, o padrão de peso molecular utilizado foi de 1k pb (Invitrogen). As corridas dos géis foram realizadas com tampão TAE 1X Ambion (Tris 0,04 mM, Acetato 0,004 mM e EDTA 0,001 mM). Os ácidos nucleicos foram corados com brometo de etídio. A fotodocumentação foi realizada com equipamento Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation system.

Fonte: Elaboração própria

4.1.2.2 PCR convencional

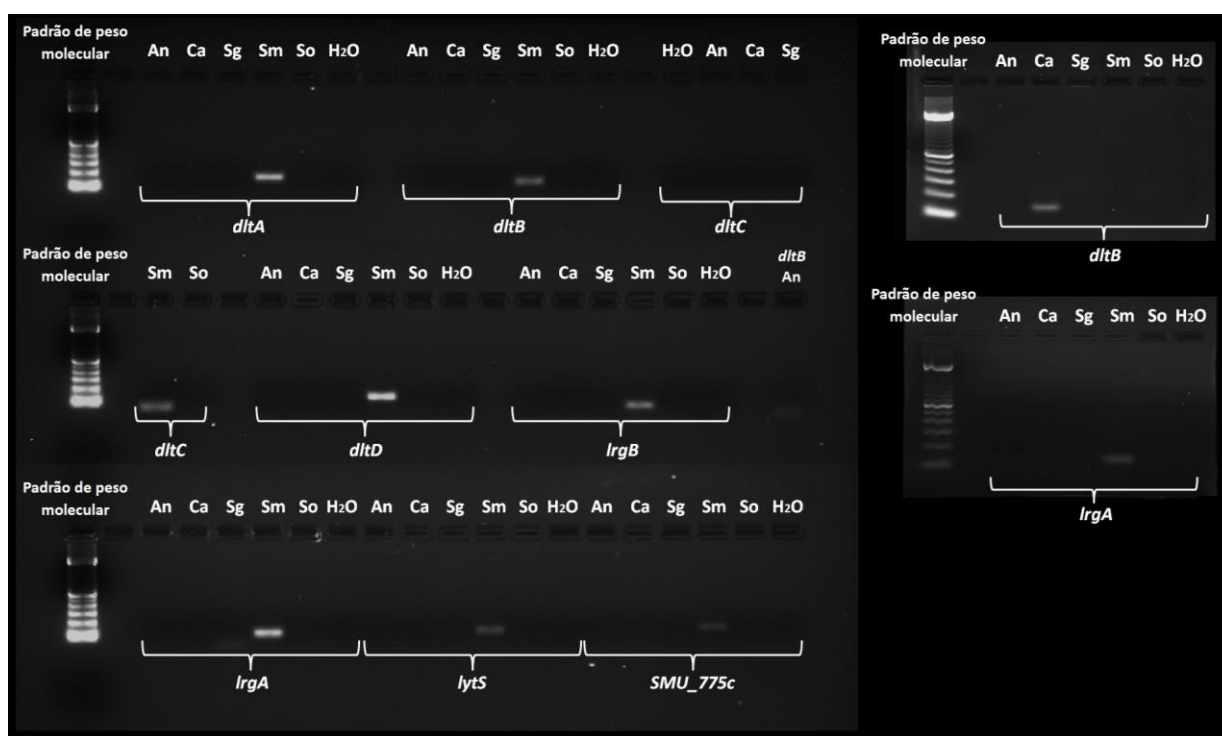
Os *primers* sintetizados foram testados através de PCR convencional contra o painel genômico dos cinco microrganismos para verificar o tamanho do produto amplificado e descartar a ocorrência de reação cruzada.

Uma alíquota de 1 µl do DNA de cada cepa na concentração de 100 ng/µl foi submetido às reações de PCR convencional com cada *primer* específico para os genes de interesse. Foi utilizado o kit iTaq DNA Polymerase (BioRad) e para uma reação de 50 µL PCR, foram misturados 40,25 µL de água de grau molecular (Invitrogen), 5 µl de iTaq buffer 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de *primer* mix 10 µM (*primers* sense e antisense) e 0,25 µL de iTaq DNA polymerase. O ciclo de amplificação utilizado foi: 95 °C/3 min (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 95 °C / 15 seg (desnaturação), 50 °C / 30 seg (*annealing*), 72 °C / 11 seg (extensão), ao termino dos ciclos, a temperatura foi mantida em 4 °C (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, BioRad). Os produtos de PCR

foram utilizados imediatamente para análise em gel de agarose 1% e depois armazenados a -20 °C.

Observou-se que todos os *primers* foram específicos e não apresentaram reação cruzada (Figura 12). No gel (lado esquerdo) observou-se contaminação nas amostras amplificadas pelos *primers* dos genes *dltB* (amostra correspondente a *dltB* e DNA de *A. naeslundii* foi carregada em duplicata devido a um vazamento para fora do poço) e *IrgA*. Portanto, o teste foi repetido para ter certeza da sua especificidade (lado direito da Figura 12).

Figura 12 - Eletroforese dos produtos de PCR



Eletroforese dos produtos de PCR dos primers testados contra o painel genômico de diferentes microrganismos em gel de agarose a 1%, mostrando a especificidade dos primers delineados. Na imagem foram colocadas as legendas dos primers e as iniciais dos microrganismos da seguinte maneira: *A. naeslundii* (An), *C. albicans* (Ca), *S. mutans* (Sm), *S. gordonii* (Sg) e *S. oralis* (So). As corridas dos géis foram realizadas com tampão TAE 1X Ambion, o padrão de peso molecular utilizado foi de 1k pb (Invitrogen), e os ácidos nucleicos foram corados com brometo de etídio. A fotodocumentação foi realizada com equipamento Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation system.

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2.3 Determinação da concentração ótima de cada par de primers

A concentração ótima de cada par de *primers* foi determinada utilizando qPCR, com SYBR green e DNA genômico de *S. mutans* (10 η g/ μ L), utilizando-se as concentrações de *primers* a 200, 225, 250, 275 e 300 η M. Na Tabela 5 estão especificadas as quantidades dos reagentes utilizados por reação de 25 μ l. Os reagentes do Master Mix (sem DNA) são misturados nas quantidades necessárias para ter duplicatas na placa para usar como *template* DNA e também água (controle da reação), observe que os volumes que variam são da solução trabalho de *primers* e de água (em negrito). As reações foram submetidas ao seguinte ciclo no equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad): passo 1 - (1X) 95 °C/ 3 min; passo 2 - (35X) 95 °C/ 15 seg, 58 °C/ 30 seg, 68 °C/ 15 seg (coleta de dados e as análises em tempo real); passo 3 (1X) 95 °C/ 1 min; passo 4 - (1X) 55 °C/ 1 min; passo 5 - incremento gradativo de 0,5 °C enquanto se captura a imagem (80X), indo de 55 °C até 95 °C (80X), para análise da *melting curve*.

Tabela 5 - Preparo de reações para qPCR para testar concentração dos *primers*.

	200 η M	225 η M	250 η M	300 η M
Componente	Volume	Volume	Volume	Volume
DNA <i>template</i>	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
2X SYBR Green Supermix	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l
10 μ M <i>primer set</i>	0,5 μl	0,5625 μl	0,625 μl	0,75 μl
Água de grau molecular	11,5 μl	11,4375 μl	11,375 μl	11,25 μl
Total	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l

Fonte: Elaboração própria.

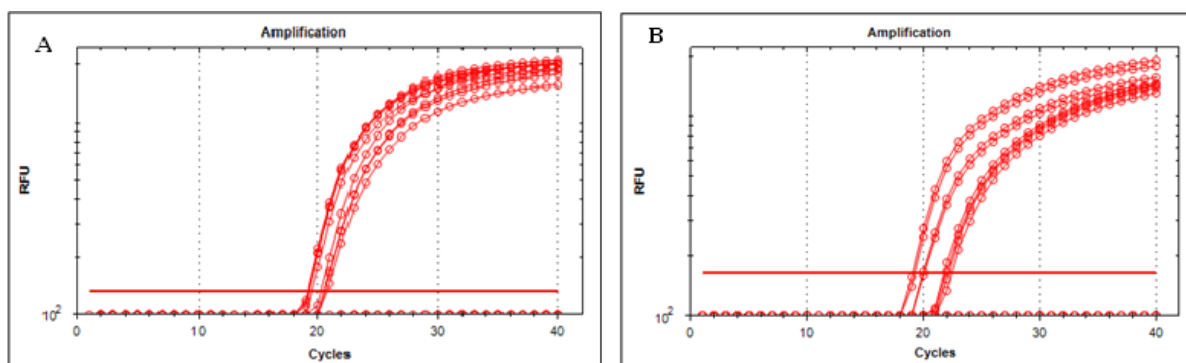
Foi realizada a análise de *amplification plots* obtidos durante a determinação da concentração ótima dos *primers*. Considera-se a concentração ótima aquela que apresentar menor *Cq* ou *quantification cycle* (anteriormente chamado de *Ct* ou *threshold cycle*). A Figura 13 ilustra dois exemplos dos *primers* testados. As concentrações ótimas encontradas para cada *primer* estão citadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Características e concentrações ótimas dos *primers* desenhados

Nome do gene	Tamanho Produto	Primer sense	Tm	GC%	Primer antisense	Tm	GC%	Concentração ótima
<i>dltA</i>	154	AGTTATTGCTGTTGATGA	55,1	33,3	CCCTGAAGTAAAGATGATA	54,7	36,8	250nM
<i>dltB</i>	130	TGTCTTCATGTCTATCTTAC	55,5	35	TTCCATAATCATACCTACTG	55,3	35	250nM
<i>dltC</i>	90	TATCACTGTTCTGTTTC	55,2	38,9	TAAGCATTTCGTAAGTCC	55,7	38,9	250nM
<i>dltD</i>	148	GCTTTATCACCTAGTAGTT	55,1	36,8	GATTATAACGCTCTGCTA	54,9	38,9	250nM
<i>lrgB</i>	96	GTAAAGGCTTCTTTCTCT	55,1	38,9	TAACATCAGTTCCCAATC	55,2	38,9	250nM
<i>lrgA</i>	109	GTCTATCTATGCTGCTATT	55	36,8	AAGGACATACATGAGAAC	54,9	38,9	300nM
<i>lytS</i>	139	TTCAGAGACTTGGTATTATC	55,5	35	TTGGAAATGATGACGAAA	55,8	33,3	300nM
SMU_775c	167	TTTGCTATTTCTGCTCTC	56	38,9	TGTGTTTGGTAAGTTTGA	55,5	33,3	250nM

Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 - Exemplos de *amplification plots* obtidos durante a determinação da concentração ótima de *primers*



Imagens geradas pelo software Bio-Rad CFX Mannager. Considera-se a concentração ótima aquela que apresentar menor Cq (quantification cycle; antigo Ct- threshold cycle). Em (A) está o gráfico obtido para o gene *dltA*, para o qual a concentração ótima é de 250 nM, pois os valores médios de Cq obtidos foram: 20,57 para 200 nM; 19,33 para 225 nM; 19,13 para 250 nM; e 20,54 para 300 nM. Em (B) está o gráfico obtido para o gene *SMU_575c*, que apresentou concentração ótima de 300 nM, pois os valores médios de Cq obtidos foram 21,84 para 200 nM; 22,26 para 225 nM; 20,01 para 250 nM; e 19,14 para 300 nM. Observação: para todos os *primers* testados os valores de Cq foram próximos nas distintas concentrações de *primer* testadas.

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2.4 Confeção de curvas padrão para a análise de expressão gênica

A confecção de curva padrão baseada no produto de PCR foi realizada seguindo a metodologia proposta por Yin et al¹⁷⁸. (2001). Os produtos de PCR foram obtidos usando DNA genômico de *S. mutans* UA159 isolado anteriormente a partir de culturas planctônicas.

Foram preparadas reações de PCR como descrito acima no item 4.1.2.2 “PCR convencional”, sendo seis reações para cada gene. Especificamente, seis alíquotas de 1 µl do DNA de *S. mutans* na concentração de 100 ng/µl foram submetidas à reações de PCR convencional, utilizado o kit iTaq DNA Polymerase (BioRad). Para uma reação de PCR de 50 µL, foram misturados 40,25 µL de água de grau molecular Invitrogen, 5 µl de iTaq buffer 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP mix (10 mM), 1 µL de primer mix 10 µM (*primers* sense e antisense), e 0,25 µL de iTaq DNA Polymerase.

O ciclo de amplificação utilizado foi: de 95 °C / 3 min (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 95 °C / 15s (desnaturação), 50 °C / 30s, 72 °C / 11s (extensão), ao término dos ciclos, a temperatura foi mantida em 4 °C. Os produtos

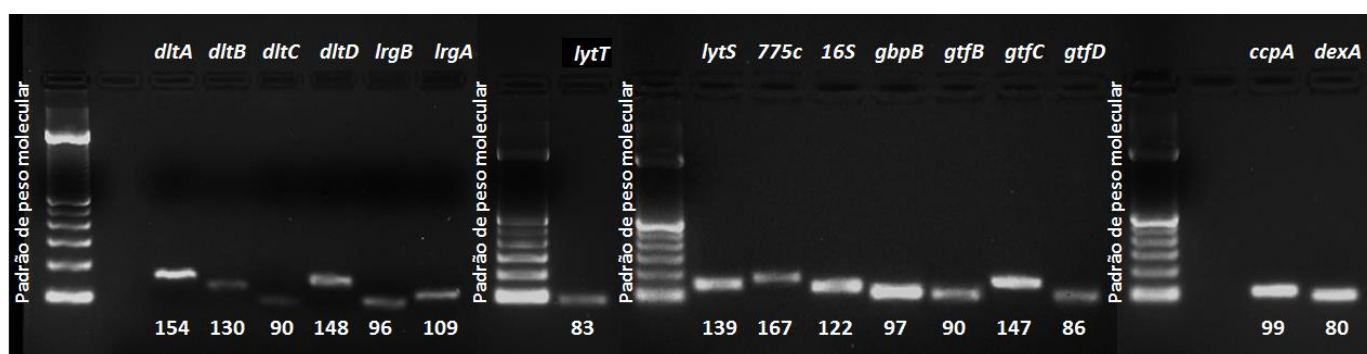
de PCR obtidos nas 6 reações para cada *primer* foram combinados e purificados com o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), segundo instruções do fabricante.

Os produtos purificados foram quantificados (D.O. 260 nm; Nano-espectrofotômetro DS-11+, Denovix), com isto se calculou o rendimento (Tabela 7), e o número de cópias de cada gene testado (Tabela 7). Mediante eletroforese em gel de agarose 2% verificou-se a integridade e o tamanho dos produtos purificados de PCR (Figura 14). O valor da concentração do produto de PCR foi utilizado para calcular o número de cópias do gene, utilizando a equação a seguir¹⁷⁸:

$$\text{Cópias/mL} = \frac{(6,023 \times 10^{23})(\text{concentração do produto de PCR em g/ml})}{(\text{Tamanho do produto de PCR em pb})(6,58 \times 10^2)}$$

Após o cálculo, os produtos foram diluídos para 2×10^{10} cópias/ μL (ver Tabela 7); e em seguida foi realizada uma diluição seriada de 10 vezes (10 μL do produto de PCR + 90 μL água de grau molecular) para chegar até 2×10^2 cópias/ μL . Para as reações de qPCR, utiliza-se uma alíquota de 0,5 μL das diluições 2×10^7 até 2×10^2 cópias/ μL por reação (volume final de 25 μL), porque a curva fica com 1×10^8 cópias/ μL até 1×10^2 cópias/ μL (Figura 15).

Figura 14 - Eletroforese dos produtos de PCR purificados



Eletroforese dos produtos de PCR purificados de todos os *primers* utilizados no estudo. As corridas dos géis foram realizadas com tampão TAE 1X Ambion, utilizou-se gel de agarose a 2%, usando o padrão de peso molecular de 1K pb (Invitrogen), e os ácidos nucleicos foram corados com brometo de etídio. A fotodocumentação foi realizada com equipamento Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation system, na parte superior estão os nomes dos genes e na inferior os tamanhos de cada *amplicon* em pares de bases.

Fonte: Elaboração própria

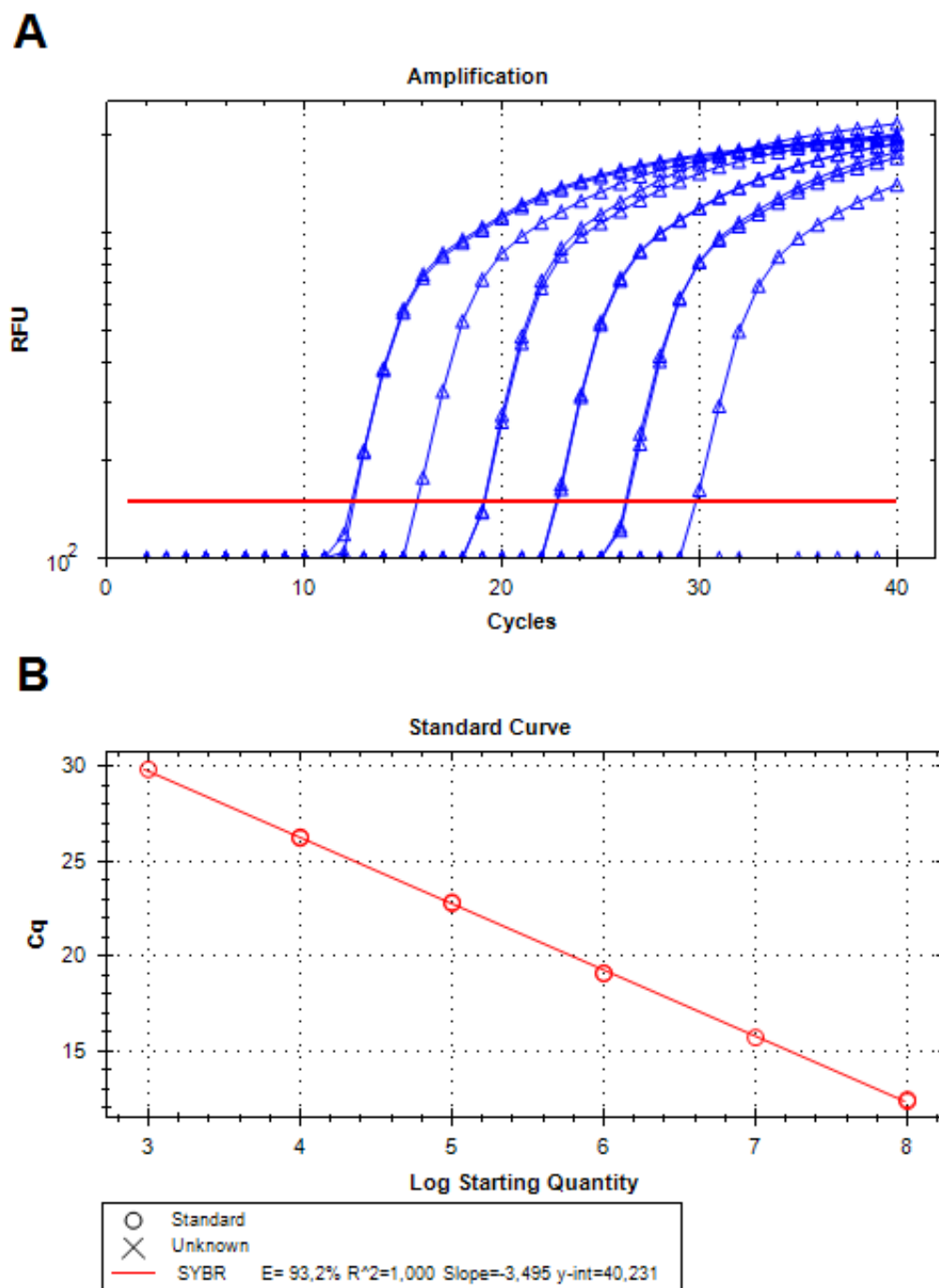
Após a obtenção das curvas para cada gene específico, foram realizadas reação de qPCR para verificar a eficiência de cada reação utilizando a concentração de *primers* determinada como ótima. A reação de qPCR consistiu de 0,5 µL de cada ponto da curva (ou de água para o *NTC* – *no template control*) amplificadas com volume de *primers* específicos (que correspondia à concentração ótima para cada gene partindo de solução trabalho de 10 µM, sense e antisense) e 12,5 µl de 2X SYBR Green Supermix (BioRad), e água de grau molecular (Invitrogen).

Tabela 7 - Dados dos produtos de PCR purificados com cálculo realizado para determinar o número de cópias de cada produto de PCR

Produto de PCR	Quantidade media (ng/μL)	Rendimento - μg total em 50 μL	Gel (0,25μg/well)	Tamanho do <i>Amplicon</i> (em pb)	cópias/mL (segundo a fórmula descrita)	cópias/μL
<i>dltA</i>	28,36	1,42	8,8	154	1,69E+14	1,69E+11
<i>dltB</i>	14,38	0,72	17,4	130	1,01E+14	1,01E+11
<i>dltC</i>	10,86	0,54	23,0	90	1,10E+14	1,10E+11
<i>dltD</i>	27,27	1,36	9,2	148	1,69E+14	1,69E+11
SMU_574c	19,57	0,98	12,8	96	1,87E+14	1,87E+11
SMU_575c	26,80	1,34	9,3	109	2,25E+14	2,25E+11
SMU_577c	16,02	0,80	15,6	139	1,05E+14	1,05E+11
SMU_775c	12,78	0,64	19,6	167	7,01E+13	7,01E+10
<i>16S RNA</i>	38,06	1,90	6,6	122	2,86E+14	2,86E+11
<i>gbpB</i>	28,18	1,41	8,9	97	2,66E+14	2,66E+11
<i>gtfB</i>	32,50	1,62	7,7	90	3,31E+14	3,31E+11
<i>gtfC</i>	53,47	2,67	4,7	147	3,33E+14	3,33E+11
<i>gtfD</i>	34,70	1,73	7,2	86	3,69E+14	3,69E+11
<i>lytS</i>	8,44	0,42	29,6	83	9,31E+13	9,31E+10
<i>ccpA</i>	16,38	0,82	15,3	99	1,51E+14	1,51E+11
<i>dexA</i>	13,80	0,69	18,1	80	1,58E+14	1,58E+11

Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Exemplo de *amplification plot* e curva padrão (*standard curve*).



Imagens geradas pelo software Bio-Rad CFX Mannager, baseada no teste das diluições seriadas de produto de PCR do gene *dltB*. (A) Observa-se que a curva apresenta parâmetros adequados. (B) Dados similares foram observados para todos os genes testados R²=0,99 e uma eficiência da reação entre 90- 100%.

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Formação de Biofilmes

Biofilmes mistos contendo *S. mutans* UA159 (cepa parental) ou $\Delta gtfB$ (cepa mutante com deleção do gene *gtfB*), *S. gordonii* DL1 e *A. naeslundii* ATCC 12104 foram desenvolvidos na presença de sacarose e amido^{77, 80, 176}. A cepa $\Delta gtfB$ foi fornecida pelo Dr. Robert A. Burne (*Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, Florida*). Os biofilmes foram avaliados em diferentes fases de desenvolvimento (29, 43, 55, 67, 79, 91, 103 e 115h) para determinação da dinâmica de expressão gênica.

4.2.1 Preparo dos biofilmes

Estoques de cada cepa estão armazenados em freezer -80 °C. As cepas foram reativadas em placas com o meio ágar sangue, incubadas por 48 horas (37 °C e 5% de CO₂). Após este período as placas foram armazenadas em geladeira (4 °C) até seu uso, por um período máximo de 15 dias.

O pré-inóculo de todas as cepas foi preparado através da transferência de 5-10 colônias individuais de cada cepa para tubos tipo falcon contendo 10 mL de meio líquido TYE + 1% de glicose. Dois tubos foram incubados durante 18 horas (37°C e 5% de CO₂). Essas culturas foram diluídas 1:20 no mesmo meio de cultura fresco, e incubadas até atingirem D.O. 540 nm de ± 1.5 para *A. naeslundii* e ± 1.0 para *S. gordonii* e *S. mutans*. Todas as culturas foram verificadas sob microscópio óptico para descartar contaminação. Essas culturas foram utilizadas para o preparo de inóculo do biofilme.

Para a formação dos biofilmes, utilizou-se 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 15).

4.2.2 Formação da película salivar

Utilizou-se um pool de saliva estimulada de voluntários (três do gênero masculino, cinco do gênero feminino), obtido pela mastigação de um pedaço de parafilme por parte de cada 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) (Anexo A). Coletado o volume desejado, misturou-se a saliva com tampão de absorção (Tampão AB – 0,05 M KCl; 0,02 M KPO₄; 0,02 M CaCl₂; 0,02 M MgCl₂) numa proporção de 1:1 (v/v) e adicionou-se 0,1 M PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma) à uma relação de 1:1000 (0,1 mM PMSF concentração final). Em seguida, o conteúdo foi centrifugado (centrifuga Eppendorf 5810) por 10 minutos a 5500 rpm 4°C. O sobrenadante (saliva totalmente clarificada) foi filtrado usando filtro de polietersulfona (PES) com tamanho de poro de 0,22 µm²².

A saliva permaneceu no gelo até a sua utilização. 2,8 ml de saliva esterilizada foram transferidos para cada poço de placa de 24 poços. Em seguida, cada aparato com dois discos de hidroxiapatita (pré-hidratados em água MiliQ esterilizada) foi transferido para a placa (com auxílio de pinça). A placa com os discos e saliva foi incubada à 37 °C, sob agitação em incubadora orbital 75 rpm (Quimis G816M20) durante 1 hora para formação da película (sHA). Os aparatos contendo discos sHA foram então enxaguados em tampão AB e transferidos para uma placa com meio de cultura contendo os microrganismos.

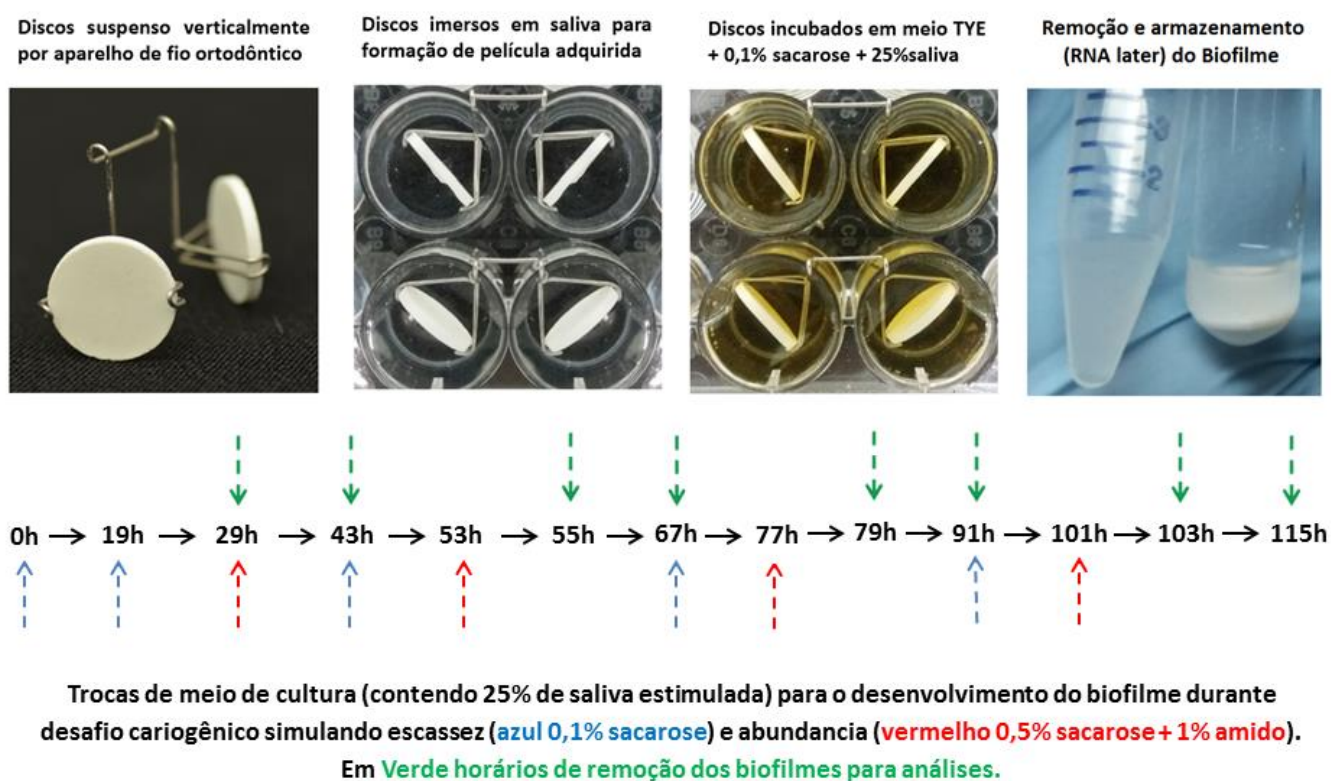
4.2.3 Inóculo bacteriano e formação do biofilme misto

Para a formação dos biofilmes de cada grupo experimental foi preparado um inóculo bacteriano das 3 espécies, utilizando-se meio líquido TYE + 0,1% de sacarose contendo 25% de saliva esterilizada²². O meio de cultura TYE foi preparado concentrado (1,25X) para que quando fosse acrescentado o volume de saliva na proporção de 1:4¹³⁵, o mesmo não ficasse em uma concentração menor de componentes. A saliva estéril era colocada previamente ao experimento para que não houvesse degradação das proteínas e para que não fossem hidrolizados os nutrientes, após a diluição de meio com a finalidade de enriquecer o meio, utilizou-se sacarose 2% fazendo uma diluição de 1:20 para que chegasse a uma concentração final de 0,1% de sacarose. Um total de 1880 µL foram removidos e descartados do volume final da solução preparada (80 mL) para que as espécies de bactérias fossem adicionadas nos seguintes volumes: 80 µL do inóculo de *S. mutans* (D.O.₅₄₀ ±1,0 ηm para obter 10⁶ UFC/mL); 1600 µL de *A. naeslundii* (D.O.₅₄₀ ±1,5 ηm para ter 10⁶ UFC/mL); e 200 µL de *S. gordonii* (D.O.₅₄₀ ±1,0 ηm para ter 10⁶ UFC/mL).

Os discos SHA foram colocados em seus respectivos poços contendo o meio inoculado. Então, foram incubados por 19 horas (37 °C, 5% de CO₂). Ainda, para o controle de qualidade de cada experimento, uma alíquota de cada inóculo foi semeada para verificar se a quantidade de cada cepa estava correta (UFC/ml). O início da incubação do biofilme foi considerado o dia 0 (idade do biofilme 0 h).

Com a intenção de avaliar os efeitos dos carboidratos que são substrato para a formação de EPS sobre o biofilme, este foi submetido a períodos de abundância ou escassez alternadamente ^{21, 115}. Foram usados dois tipos de meios: um rico em sacarose e amido (preparado como foi descrito no inóculo modificando o meio para TYE + amido 1,25X, e a sacarose 10% para chegar na concentração final de 0,5%) e outro escasso de nutrientes (mesmo meio empregado no inóculo). As trocas foram realizadas duas vezes ao dia, como descrito a seguir (Figura 16):

Figura 16 - Desenho experimental de formação de biofilmes mistos (Continua)



Formação de biofilmes mistos com 3 espécies: *S. mutans* UA 159 (10⁶ UFC/mL), *A. naeslundii* 12104 (10⁶ UFC/mL) e *S. gordonii* DL-1 (10⁶ UFC/mL). Biofilmes foram crescidos

Figura 16 - Desenho experimental de formação de biofilmes mistos (Conclusão)

sobre discos de hidroxiapatita com película e suspenso verticalmente, tendo trocas de meio em que se alternavam sacarose a 0,1% e sacarose 0,5% + amido 1% (simulando um desafio cariogênico). O meio sempre continha 25% de saliva humana estimulada e filtrada.

Fonte: Elaboração própria

- 19h de incubação: TYE + 0,1 % sacarose + saliva
- 29h de incubação: TYE + 0,5 % sacarose + 1% amido + saliva
- 43h de incubação: TYE + 0,1 % sacarose + saliva
- 53h de incubação: TYE + 0,5 % sacarose + 1% amido + saliva
- 67h de incubação: TYE + 0,1 % sacarose + saliva
- 77h de incubação: TYE + 0,5 % sacarose + 1% amido + saliva
- 91h de incubação: TYE + 0,1 % sacarose + saliva
- 101h de incubação: TYE + 0,5 % sacarose + 1% amido + saliva

Os meios de culturas velhos foram utilizados para quantificação do pH usando pHmetro (Quaxtron Qx 1500 plus), incluindo as idades de 55h, 79h e 103h nas quais os biofilmes foram retirados para processamento.

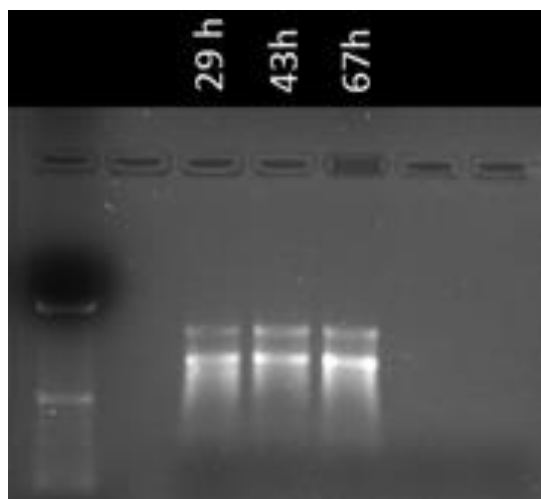
Ensaio piloto foi realizado para determinar o número de biofilmes (discos) necessários para isolar RNA em quantidade suficiente para análise de expressão gênica em cada período (Tabela 8, seguindo protocolos descritos nos itens “**4.3.1 Remoção e processamento do biofilme**” e “**4.3.2 Isolamento do RNA**”). São necessários no mínimo 4 µg de RNA total por idade e tipo de biofilme: 1 µg para verificar a integridade em gel de agarose (Figura 17), 1 µg para controle negativo da síntese de cDNA (-RT, que também mostra se há ou não contaminação por DNA), e 2 µg para síntese de cDNA em duplicata (2 tubos com +RT). Calculou-se um total de 13 aparatos por experimento para avaliar todos os tempos experimentais.

Tabela 8 - Dados de purificação do RNA de biofilmes piloto

Biofilme (idade de crescimento)	RNA após						
	RNA não		tratamento com		RNA purificado		
	purificado		DNase I				
	A	B	A	B	A	B	Pureza. Razão 260/280
	ng/ μ L	(μ g)	ng/ μ L	(μ g)	ng/ μ L	(μ g)	
29 h	433,91	20,39	755,88	13,61	467,61	7,48	2,15
43 h	405,01	19,04	809,18	14,57	558,50	8,94	2,14
67 h	436,31	20,51	717,05	12,91	568,83	9,10	2,13

Letra A representa a media das quantificações feitas para RNA (D.O.₂₆₀ nm), letra B representa o resultado do calculo de rendimento no volume total.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 17 - Amostras de RNA purificado de biofilmes piloto

Eletroforese das amostras de RNA purificados dos biofilmes nas idades de 29, 43 e 67 h. Observa-se uma banda superior correspondente a subunidade ribossomal 23S RNA e a inferior a 16S RNA. As corridas dos géis foram realizadas com tampão FA 1X + formaldeído 0,74%, utilizou-se gel de agarose 1,2% contendo formaldeído, usando o padrão de peso molecular de 1K pb (Invitrogen), e os ácidos nucleicos corados com brometo de etídio. A fotodocumentação foi realizada com equipamento Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation system. Observa-se um pouco de arraste nas amostras, o que é esperado em amostras de biofilme onde encontram-se células com diversos estágios metabólicos.

Fonte: Elaboração própria.

4.3 Isolamento do RNA e Síntese de cDNA para Análise da Dinâmica da Expressão Gênica dos Biofilmes Via qPCR

4.3.1 Remoção e processamento do biofilme

Biofilmes foram removidos para serem processados nas seguintes idades (fases de desenvolvimento de biofilmes): 29h - adesão inicial até a fase inicial (8 discos), 43h - a fase inicial (4 discos), 55h - duas horas após a troca de meio de cultura, (4 discos), 67h fase intermediária (2 discos), 79h - duas horas após troca de meio de cultura (2 discos), 91h (2 discos), 103h - duas horas após troca de meio de cultura (2 discos) e 115h - a fase tardia ou biofilmes maduros (2 discos).

Para obtenção de RNA total a remoção foi realizada como descrito seguir: os aparatos com os discos com biofilme foram tirados do meio de cultura para serem enxaguados (três vezes) com solução salina (0,89% NaCl) esterilizada. Os discos foram removidos do aparato com ajuda de pinças esterilizadas e livres de material genético (previamente lavadas com RNaseZAP Ambion e enxaguados três vezes com água MiliQ) para serem posicionados em dupla dentro de tubos de vidro estéreis e livres de material genético (previamente lavados com RNaseZAP Ambion e enxaguados três vezes com água MiliQ). Cada tubo continha 2 ml de RNAlater (Ambion).

Os tubos contendo os discos foram transferidos para um béquer com água e gelo para efetuar a remoção da biomassa da superfície, usando banho ultrassônico (Kondortech) durante 10 minutos. Após, a suspensão de cada biofilme foi coletada em tubos de centrifugação de 15 ml (tipo falcon), já que a solução de RNAlater é ácida e pode remover minerais dos discos, e a presença de alta concentração mineral pode afetar o rendimento de RNA a ser extraído⁸⁰.

Adicionaram-se mais 2 ml de RNAlater em cada tubo de vidro e raspavam-se as superfícies dos discos com espátulas de aço inoxidável esterilizadas e livres de material genético (previamente lavadas com RNaseZAP Ambion e enxaguados três vezes com água MiliQ) com a finalidade de remover o biofilme residual. Novamente a suspensão foi coletada e transferida para o mesmo tubo falcon, o material foi armazenado a -80°C até o isolamento de RNA.

4.3.2 Isolamento do RNA

O RNA foi extraído usando o método de separação fenol-clorofórmio (usando a capela de exaustão de gases), e purificado via tratamento com DNase em coluna (RNeasy Micro Kit, Qiagen) e em solução (TURBO DNase; Ambion), descrito por Cury e Koo²⁷ (2007). A DNase foi removida usando o RNeasy MinElute clean-up kit (Qiagen). Espectrofotometria foi utilizada para avaliar a quantidade (D.O.₂₆₀ nm) e a pureza (razão D.O. 260/280) do RNA total (Nano-espectrofotômetro DS-11+).

A concentração e o rendimento de RNA obtido nas etapas realizadas para sua purificação são exibidos na Tabela 9 para os biofilmes de UA159 (cepa parental) e na Tabela 10 para os biofilmes de *ΔgtfB* (cepa mutante). Observa-se uma perda no rendimento de ácido nucleico de 50-60%, o que é esperado para amostras de biofilmes. A integridade do RNA purificado dos biofilmes foi determinada por eletroforese em gel de agarose 2% (1 µg RNA / canaleta) (Figura 18).

Tabela 9 - Dados de purificação do RNA de biofilmes UA159

Biofilme (Idade de crescimento)	RNA após o tratamento com							
	RNA não purificado			DNAse I na coluna		RNA purificado		Razão 260/280
	ηg/μl	Rendimento (μg)		ηg/μl	Rendimento (μg)		Rendimento (μg)	
Biofilme I	29 h	1323,80	62,22	781,14	13,28	684,03	10,94	2,15
	43h	1267,75	59,58	1325,59	23,86	1002,38	16,04	2,14
	55h	2522,27	118,55	1431,86	25,77	1203,42	19,25	2,125
	67h	839,07	39,44	910,17	16,38	937,785	15,00	2,185
	79h	1462,34	68,73	1444,76	26,01	1293,93	20,70	2,14
	91h	2173,45	102,15	1237,89	22,28	1128,25	18,05	2,115
	103h	3163,33	148,68	1532,81	27,59	750,075	12,00	2,185
	115h	2794,71	131,35	1484,08	26,71	757,775	12,12	2,165
Biofilme II	29 h	1196,795	56,25	1435,3	25,84	1055,6	16,89	2,11
	43h	1202,155	56,50	1476,18	26,57	1724,155	27,59	2,07
	55h	1764,885	82,95	1081,46	19,47	814,27	13,03	2,2
	67h	1426,88	67,06	1498,86	26,98	819,665	13,11	2,20
	79h	2259,86	106,21	1511,3	27,20	1750,49	28,01	2,09
	91h	2025,185	95,18	1148,65	20,68	1179,315	18,87	2,08
	103h	3126,57	146,95	2057,12	37,03	1092,26	17,48	2,06
	115h	2201,24	103,46	1503,29	27,06	855,895	13,69	2,19

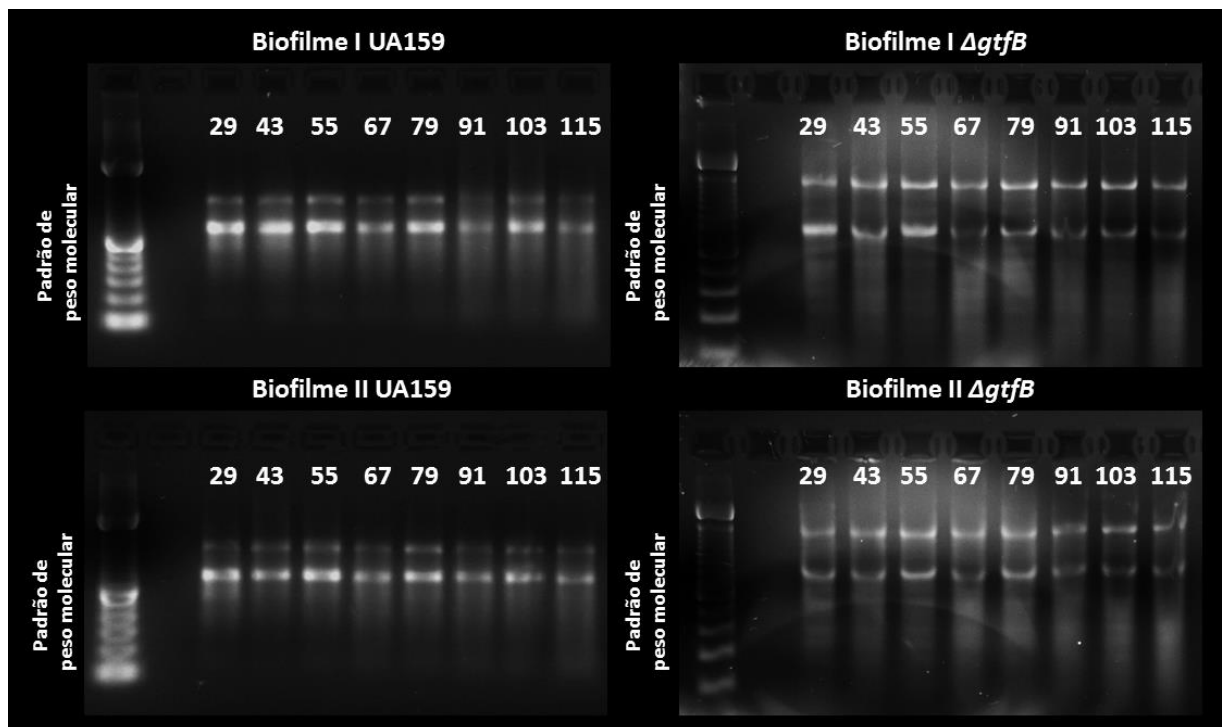
Fonte: Elaboração própria

Tabela 10 - Dados de purificação do RNA de biofilmes *ΔgtfB*

Biofilme (Idade de crescimento)		RNA não purificado		RNA após o tratamento com DNase I na coluna		RNA purificado		Pureza 260/280
		ng/μl	Rendimento (μg)	ng/μl	Rendimento (μg)	ng/μl	Rendimento (μg)	
Biofilme I	29 h	1274,29	59,89	1079,92	18,36	882,43	14,12	2,21
	43h	892,98	41,97	1187,03	21,37	1116,05	17,86	2,10
	55h	1891,16	88,88	1269,36	21,58	1108,8	17,74	2,09
	67h	1266,47	59,52	1397,43	25,15	940,235	15,04	2,22
	79h	2181,98	102,55	1435,96	25,85	1136,645	18,19	2,09
	91h	2217,28	104,21	1314,18	23,66	1040,86	16,65	2,09
	103h	3027,63	142,30	1406,42	25,32	1247,28	19,96	2,10
	115h	2921,45	137,31	1152,09	19,59	1023,015	16,37	2,15
Biofilme II	29 h	1095,17	51,47	728,42	12,38	617,77	9,88	2,15
	43h	1190,17	55,94	1103,65	19,87	1157,955	18,53	2,11
	55h	2407,82	113,17	1300,24	22,10	1197,82	19,17	2,07
	67h	1233,77	57,99	1217,58	21,92	939,14	15,03	2,20
	79h	1918,85	90,19	1333,59	24,00	1008,57	16,14	2,13
	91h	1954,25	91,85	1085,62	19,54	963,93	15,42	2,15
	103h	3101,01	145,75	1457,67	26,24	1221,68	19,55	2,09
	115h	2965,99	139,40	1094,63	18,61	976,01	15,62	2,17

Fonte: Elaboração própria

Figura 18 - Amostras de RNA purificado de biofilmes mistos



Eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de RNA purificados dos biofilmes nas idades de 29, 43, 55, 67, 79, 91, 103 e 115h. Observa-se integridade nas duas bandas correspondendo a 23S RNA (banda superior) e a 16S RNA (banda inferior). As corridas dos géis foram realizadas com tampão FA 1X + formaldeído 0,74%, usando um padrão de peso molecular de 1K pb DNA (Invitrogen), e os ácidos nucleicos foram corados com brometo de etídio. A fotodocumentação foi realizada com equipamento Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation system. Observa-se um arraste nas amostras por degradação do material genético, devido ao envelhecimento do biofilme.

Fonte: Elaboração própria.

4.3.3 Síntese de cDNA

O RNA foi diluído a uma concentração de 200 ng/μL e armazenado em freezer -80°C. O cDNA foi sintetizado em duplicata com o iScript kit (BioRad) utilizando 1 μg de RNA total (5 μL da solução em concentração 200 ng/μL), misturando com 4 μL do tampão 5X iScript, 1 μL da enzima transcriptase reversa, e 10 μL de água de grau molecular (BioRad), completando um volume de 20 μL (i.e., amostras +RT). Reações contendo todos os reagentes do kit, exceto a transcriptase reversa foram os controles negativos, que serviram para determinar se tinha contaminação com DNA (i.e., amostras -RT). As reações foram incubadas usando o

equipamento CFX96 (BioRad), com o ciclo: 25°C/5 min, 42°C/30 min, 85°C/5 min, 4°C ∞. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até sua diluição (1:5 e 1:1.000 com água de grau molecular) e uso para quantificação da expressão gênica (qPCR) ^{20, 114}.

4.3.4 Expressão gênica via qPCR

Para qPCR, se utilizou a reação como foi descrita na verificação das curvas padrão baseadas nos produtos de PCR. Para +RT cDNA diluído 1:5 foi usado para detectar os genes de interesse, enquanto a diluição 1:1.000 foi usada para o gene 16S rRNA utilizado para normalização de expressão de genes específicos como relatado por Stipp et al.¹⁵⁶ (2008) e ilustrado na Figura 19. Com a finalidade de avaliar os controles negativos do cDNA dos biofilmes das duas cepas (os quais não deviam apresentar expressão gênica), se fez uma placa utilizando como *primer* o 16S rRNA, ao ser analisada, observou-se que a detecção de produto de PCR nas amostras –RT passava pela linha de *threshold* entorno do ciclo 30, enquanto que os +RT entorno do ciclo 20.

Figura 19 - Organização de placa para avaliação de expressão gênica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std-1	Std-1	Unk-1	Unk-1	Unk-9	Unk-9	Std-7	Std-7	Unk-17	Unk-17	Unk-25	Unk-25
	SYBR 16S	SYBR 16S	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II	SYBR gtfD	SYBR gtfD	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II
B	Std-2	Std-2	Unk-2	Unk-2	Unk-10	Unk-10	Std-8	Std-8	Unk-18	Unk-18	Unk-26	Unk-26
	SYBR 16S	SYBR 16S	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II	SYBR gtfD	SYBR gtfD	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II
C	Std-3	Std-3	Unk-3	Unk-3	Unk-11	Unk-11	Std-9	Std-9	Unk-19	Unk-19	Unk-27	Unk-27
	SYBR 16S	SYBR 16S	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II	SYBR gtfD	SYBR gtfD	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II
D	Std-4	Std-4	Unk-4	Unk-4	Unk-12	Unk-12	Std-10	Std-10	Unk-20	Unk-20	Unk-28	Unk-28
	SYBR 16S	SYBR 16S	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II	SYBR gtfD	SYBR gtfD	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II
E	Std-5	Std-5	Unk-5	Unk-5	Unk-13	Unk-13	Std-11	Std-11	Unk-21	Unk-21	Unk-29	Unk-29
	SYBR 16S	SYBR 16S	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II	SYBR gtfD	SYBR gtfD	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II
F	Std-6	Std-6	Unk-6	Unk-6	Unk-14	Unk-14	Std-12	Std-12	Unk-22	Unk-22	Unk-30	Unk-30
	SYBR 16S	SYBR 16S	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II	SYBR gtfD	SYBR gtfD	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II
G	Unk	Unk	Unk-7	Unk-7	Unk-15	Unk-15	Unk	Unk	Unk-23	Unk-23	Unk-31	Unk-31
			16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II			gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II
H	NTC	NTC	Unk-8	Unk-8	Unk-16	Unk-16	NTC	NTC	Unk-24	Unk-24	Unk-32	Unk-32
	SYBR 16S	SYBR 16S	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm I	16S rRNA Biofilm II	16S rRNA Biofilm II	gtfD	gtfD	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm I	gtfD Biofilm II	gtfD Biofilm II

Exemplo da organização das placas para serem carregadas e realizar qPCR, imagens geradas pelo software Bio-Rad CFX Manager, no momento de realizar a edição das placas. Observa-se no lado esquerdo o gene 16S rRNA, a curva padrão em duplicata nas colunas 1 e 2, amostras em duplicata do primeiro biofilme nas colunas 3 e 4, e amostras em duplicata do segundo biofilme nas colunas 5 e 6. Da mesma forma encontra-se organizado o gene de interesse, no caso *gtfD*.

Fonte: Elaboração própria.

4.4 Análises Estatísticas

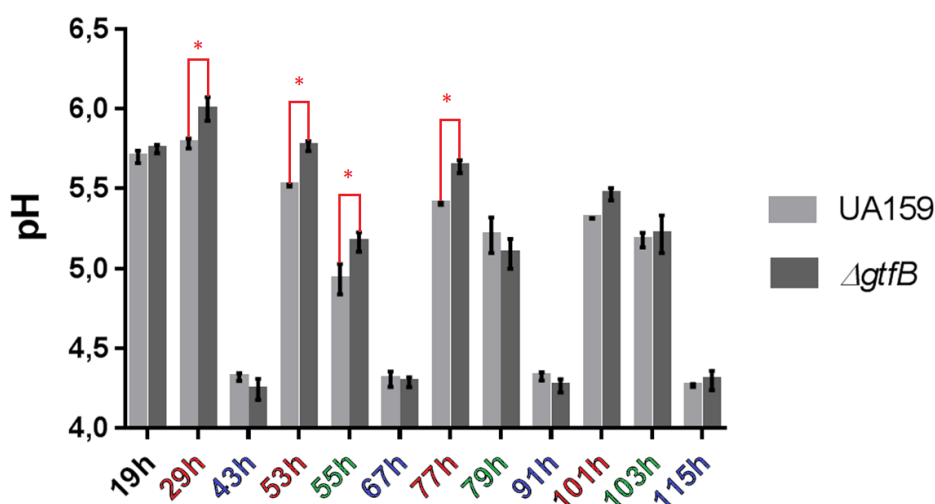
Os dados obtidos foram analisados para examinar longitudinalmente a dinâmica da expressão gênica do biofilme formado pela cepa parental de *S. mutans* UA159 e pela cepa mutante $\Delta gtfB$, com o software Prism 7 (GraphPad Software, Inc., 2016). Para cada um dos grupos experimentais foram realizadas análises de distribuição e de variâncias a um critério (ANOVA *one way*), seguido de pós teste de Tukey com $\alpha=0,05$. Realizou-se correlação de Pearson ($\alpha \leq 0,05$) entre os níveis de expressão e as idades do biofilme (analisando separadamente os períodos que tinham quantidades distintas de carboidratos, abundância e escassez). Os valores de pH e os níveis de expressão gênica dos dois grupos experimentais foram comparados mediante análise de variâncias a dois critérios (ANOVA *two way*) com pós teste de Sidak ($\alpha \leq 0,05$). Para esclarecer se os genes tiveram um comportamento semelhante entre os tipos de biofilmes, realizou-se correlação de Pearson entre as médias das diferentes idades ($\alpha \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Dinâmica do pH do Meio de Cultura Durante o Crescimento dos Biofilmes

Com as medições do pH do meio de cultura se geraram gráficos para esclarecer o comportamento do biofilme de forma longitudinal (Figura 20), observando-se uma semelhança entre os biofilmes mistos das duas cepas de *S. mutans*. Para confirmar se as diferenças eram estatisticamente significantes, realizou-se ANOVA a dois fatores com pós teste de Sidak ($\alpha \leq 0,05$) (Figura 20). Os horários que apresentaram diferenças entre os dois biofilmes foram sinalizados com um asterisco, 29h ($p = 0,0101$), 53h ($p = 0,0028$), 55h ($p = 0,0047$), 77h ($p = 0,0045$). Para confirmar se existia uma diminuição do pH nos horários em que os biofilmes ficaram 10 h em meio de escassez foi feita uma correlação entre a idade e média do pH (Figura 21), observou-se uma correlação negativa ($r = -0,9669$ para UA159 e $r = -0,9933$ para $\Delta gtfB$) com significância estatística ($p = 0,0331$ e $p = 0,0067$ respectivamente).

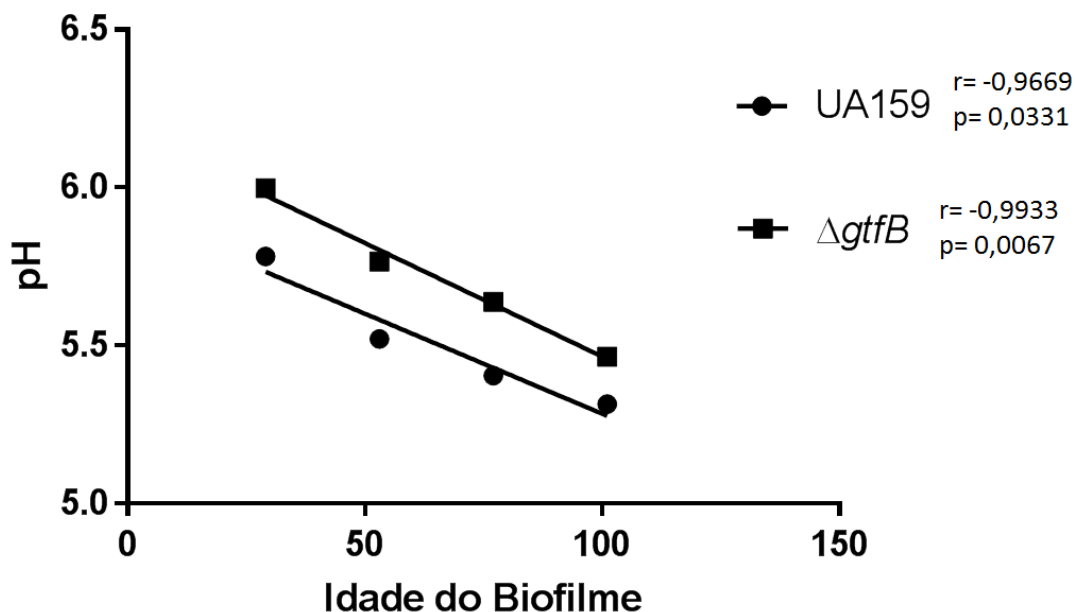
Figura 20 - ANOVA a dois fatores para pH do meio de cultura dos biofilmes



Observam-se os valores registrados do pH nos biofilmes nas diferentes idades (horário de 19h representa a fase de adesão dos microrganismos, horários em vermelho representam 10h em meio de escassez, horários em azul representam 14h em meio de abundância, horários em verde representam 2h em meio de abundância) tendo um comportamento semelhante entre eles, com algumas diferenças numéricas, as quais foram sinalizadas com um asterisco. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad. Os dados mostrados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão. O eixo Y apresenta os valores de pH, enquanto o eixo X apresenta as idades dos biofilmes.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 21 - Correlação entre idade e pH nos biofilmes



O gráfico mostra as correlações encontradas entre idade (29, 53, 77 e 101h, eixo X) e pH (eixo Y). São exibidos também os valores de r (coeficiente de correlação de Pearson) e p (nível de significância estatística). Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Dinâmica de Expressão Gênica de *S. mutans* em Biofilmes Mistos

Analísaram-se e apresentaram-se separadamente os resultados da dinâmica da expressão gênica de cada dos biofilmes formados pelas duas cepas, ilustrados em grupos funcionais de acordo com os três principais componentes da MEC.

5.2.1 Dinâmica de expressão gênica de *S. mutans* UA159

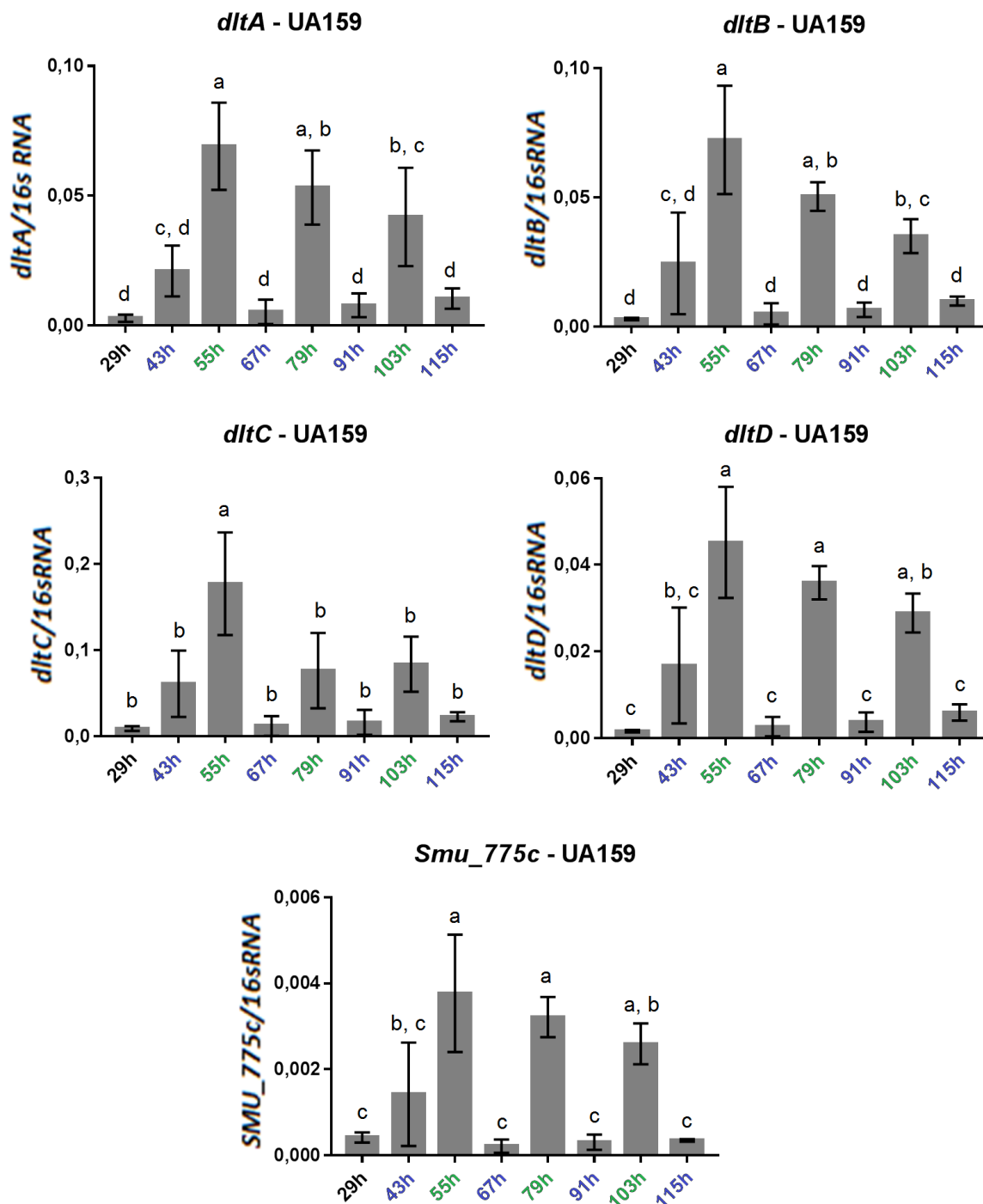
Todos os genes associados com a síntese de ácidos lipoteicóicos apresentaram os valores mais altos de expressão no horário de 55h, duas horas após fornecer um meio rico em nutrientes (Figura 22), e os menores valores se registraram em 29, 67, 91 e 115h. Para o gene *dltA* além da diferença já descrita, observou-se que os valores de expressão em 55 e 79h foram semelhantes, mas foram menores ao serem comparados com 43h ($p \leq 0,0374$). O gene *dltB* teve o mesmo comportamento de expressão que o gene *dltA*, com menor expressão em

29, 67, 91 e 115h; apresentando diferença com 55, 79 e 103h. Ainda, a expressão de *dltB* em 43h apresentou diferença com a expressão em 55 e 79h ($p \leq 0,0411$). O gene *dltC* apresentou diferença de expressão entre 55h e os demais períodos ($p \leq 0,0106$). No caso do gene *dltD* evidenciou-se semelhança entre os três períodos ricos em recursos, os valores em 103h tiveram semelhança com 43h, que por sua vez, não apresentou diferença com os horários de menor expressão ($p \leq 0,0143$). O gene *SMU_775c* teve a mesma dinâmica de expressão que o gene *dltD* ($p \leq 0,0408$).

Com o desenvolvimento e amadurecimento do biofilme, se percebeu uma diminuição na expressão gênica, realizaram-se correlações (Figura 23), comparando-se os períodos com características semelhantes:

- Meio de cultura “fresco” com abundância de recursos e pH entorno de 5 (idades 55, 79 e 103h).
- Meios de cultura “velhos” onde teoricamente os recursos deviam estar mais escassos (após de 14h de incubação, idades 43, 67, 91 e 115h) e com pH mais ácidos $< 4,5$.
- A idade de 29h (adesão inicial até a fase inicial) foi tomado como *baseline*.

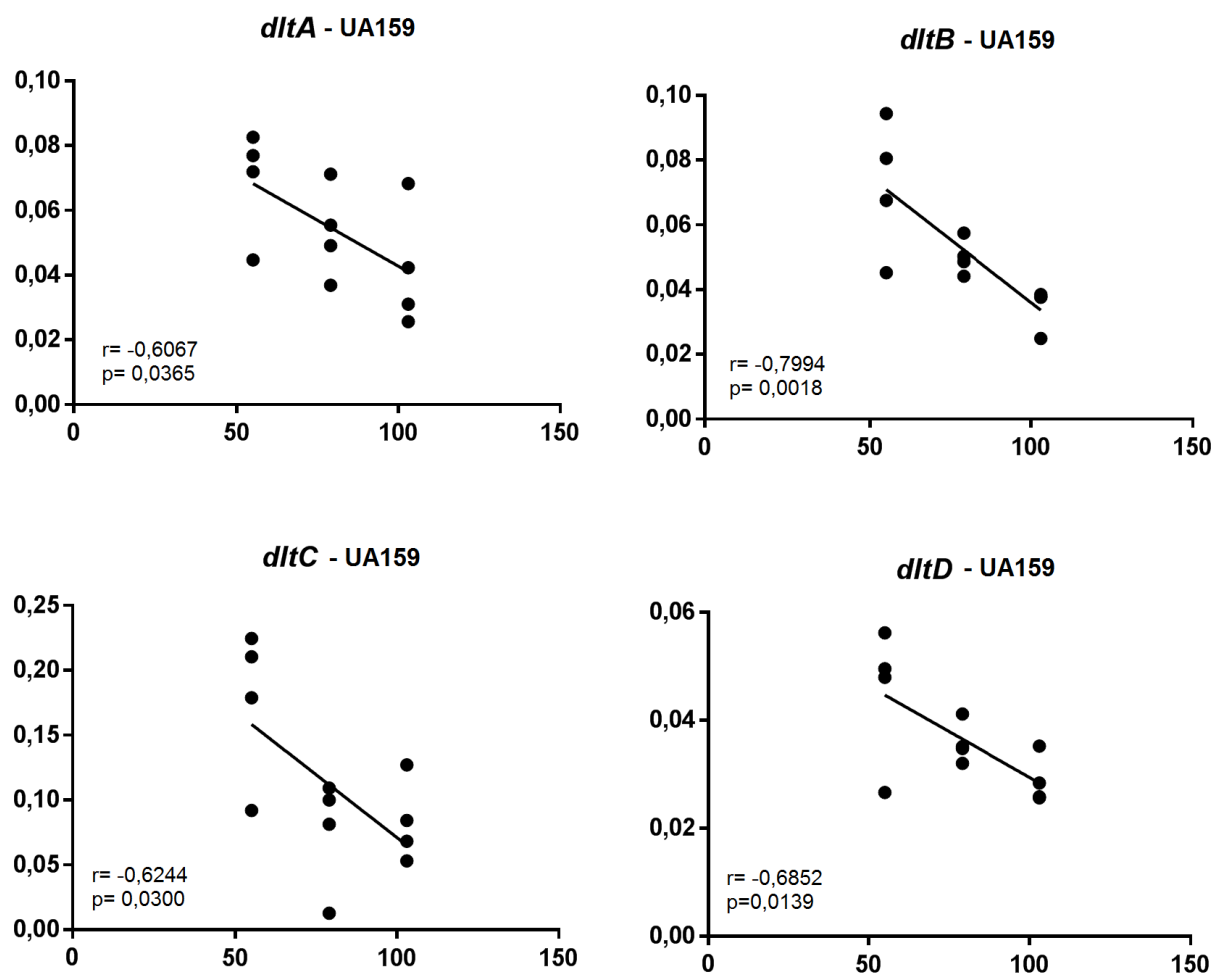
Figura 22 - Expressão dos genes associados ao metabolismo de LTA - UA159



Dinâmica de expressão dos genes associados com metabolismo de LTA, onde é observado uma maior expressão nos horários em que o meio estava “fresco” e abundante em recursos (horários em verde) com um pH entorno de 5, os menores valores se registraram nos períodos que o meio estava “velho” (horários em azul). Os dados mostrados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão. O eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). As letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas na expressão entre as diferentes idades do biofilme. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Correlação entre idade e expressão dos genes associados ao metabolismo de LTA – UA159



Os gráficos apresentados mostram as correlações encontradas entre idade (eixo X, 55, 79 e 103h) e expressão gênica (eixo Y), são exibidos também os valores de r (coeficiente de correlação de Pearson) e p (nível de significância estatística). Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Foram detectadas correlações negativas moderadas com significância estatística para os genes *dltA* ($r = -0,6067$; $p = 0,0365$), *dltC* ($r = -0,6244$; $p = 0,03$) e *dltD* ($r = -0,6852$; $p = 0,0139$). Para o gene *dltB* a correlação foi considerada forte ($r = -0,7994$; $p = 0,0018$), enquanto que o gene SMU_775c teve uma correlação fraca ($r \leq 0,5$) e sem significância estatística. Todas as correlações feitas entre 43, 67, 91 e 115h foram fracas ($r \leq 0,5$) e sem significância estatística (gráficos não mostrados).

Os genes relacionados com eDNA apresentaram três dinâmicas de expressão diferentes (Figura 24). Os genes associados a remodelação da parede celular e

autólise (*lrgAB*) tiveram o pico de expressão em 29h, sendo estatisticamente diferentes da expressão detectada nas demais idades (*lrgB* com $p \leq 0,0025$ e *lrgA* com $p \leq 0,0075$). Os genes do sistema regulador de dois componentes LytST tiveram os menores valores de expressão neste estudo. Porém, para *lytT* não se encontraram diferenças estatisticamente significantes entre as idades do biofilme ($p > 0,05$).

Figura 24 - Expressão dos genes associados à eDNA – UA159 (Continua)

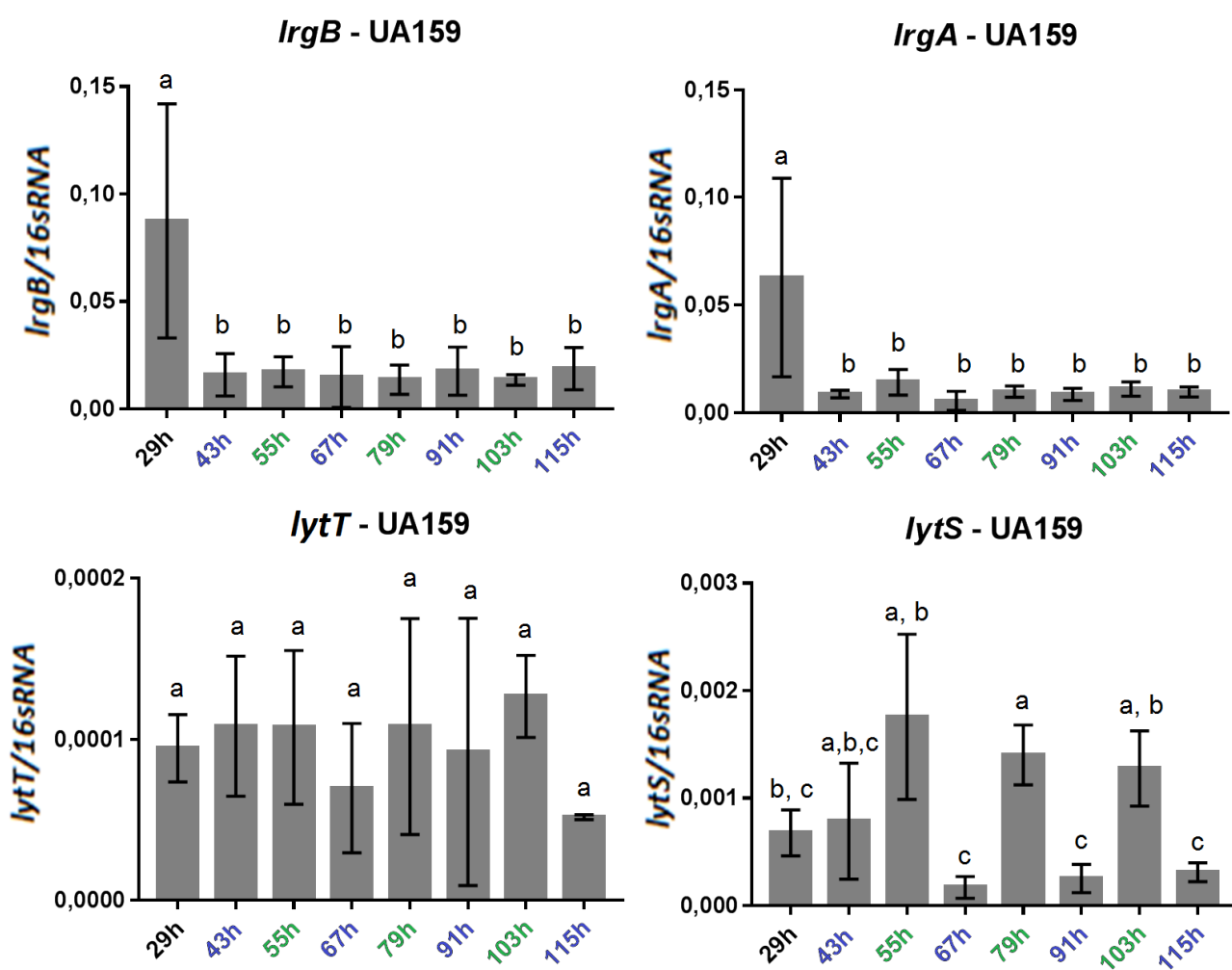
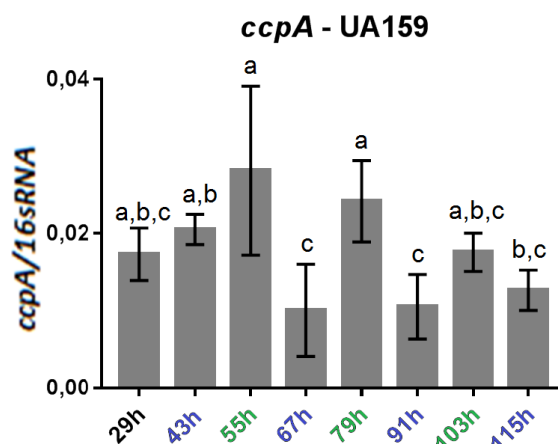


Figura 24 - Expressão dos genes associados à eDNA – UA159 (Conclusão)

Os genes associados com síntese de eDNA apresentam três dinâmicas diferentes. Os genes *lrgAB* foram altamente expressos só em 29h (adesão inicial até a fase inicial), o gene *lytT* teve os menores valores no estudo e não apresentou diferença estatística entre os horários, os genes *lytS* e *ccpA* tiveram os valores de maior expressão as 55 e 79 (horários em verde com meio “fresco” e abundante em recursos) apresentando uma diferença com 67, 91 e 115h (horários em azul com meio “velho”). Os dados mostrados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão. O eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). As letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significantes na expressão entre as diferentes idades do biofilme. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

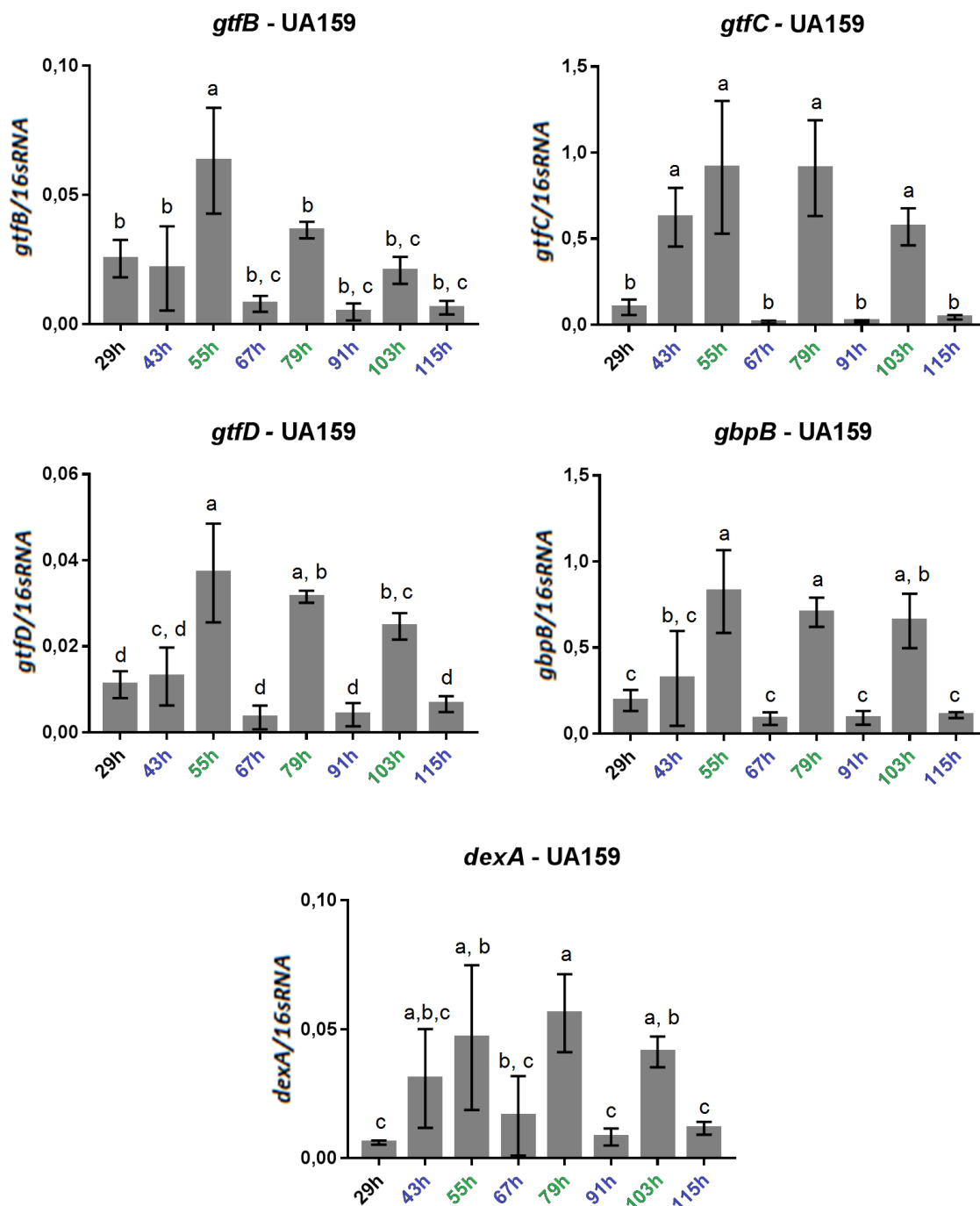
O gene *lytS* apresentou diferença estatisticamente significativa nos horários de 55, 79 e 103h quando foram comparados com 67, 91 e 115h, enquanto o horário de 43h não apresentou diferença com nenhum dos horários ($p \leq 0,0278$). O gene *ccpA* por sua vez, também apresentou diferença estatística entre os horários 55 e 79h quando comparados com 67 e 91h ($p \leq 0,0262$); porém, nos horários 29, 43, 103 e 115h a magnitude de expressão foram iguais.

Para os horários do meio “velho” se encontraram correlações fracas ($r \leq 0,5$) para os genes *lytT*, *lytS* e *ccpA*, e para os genes *lrgA* e *lrgB* a correlação foi negligenciável ($r \leq 0,3$); todas essas correlações não tiveram significância estatística. Nos horários em que o biofilme se encontrava com um pH menos ácido as correlações foram negligenciáveis ($r \leq 0,3$) para os genes *lrgB*, *lytT* e *lytS*, enquanto que as correlações foram fraca para o gene *lrgA* ($r \leq 0,5$) e negativa e moderada para o gene *ccpA* ($r = -0,518$); porém, em nenhum dessas correlações achou-se

uma diferença estatisticamente significativa, razão pela qual os gráficos não foram apresentados.

O gene *gtfB* associado com a síntese de exopolissacarídeos insolúveis apresentou os maiores valores de expressão no horário de 55h sendo diferente das demais idades (Figura 25); nos horários 67, 91 e 115h os níveis de expressão foram os menores, e não tiveram diferença com o horário de 103h ($p \leq 0,0171$). Ao ser observado de forma geral, os maiores níveis de expressão corresponderam ao gene *gtfC* encarregado de sintetizar EPS solúveis e insolúveis. Os maiores valores para *gtfC* se registraram nos horários 43, 55, 79 e 103 e os menores às 29, 67 91 e 115h, tendo uma diferença significativa entre eles ($p \leq 0,0261$). O gene *gtfD* apresentou diferença estatisticamente significativa nos horários de 55, 79 e 103h (menos ácidos) quando foram comparados com os horários 43, 67, 91 e 115h (mais ácidos), só houve semelhança entre a idade de 43h ao compor com 103h ($p \leq 0,0278$).

Ao ser avaliada a expressão do gene *gbpB* encarregado da ligação dos glucanos evidenciou-se a maior expressão duas horas após fornecido um meio rico em carboidratos (exceto as 103h que foi igual à 43h), os níveis de baixa expressão foram após de períodos prolongados de incubação ≥ 10 h ($p \leq 0,0213$) (Figura 25). Para o gene que codifica a dextranase A, evidencia-se menores valores de expressão para 29, 91 e 115h, sendo estatisticamente diferentes aos horários 55, 79 e 103h ($p \leq 0,0383$); o horário de 43h não apresentou diferença com nenhum dos horários avaliados.

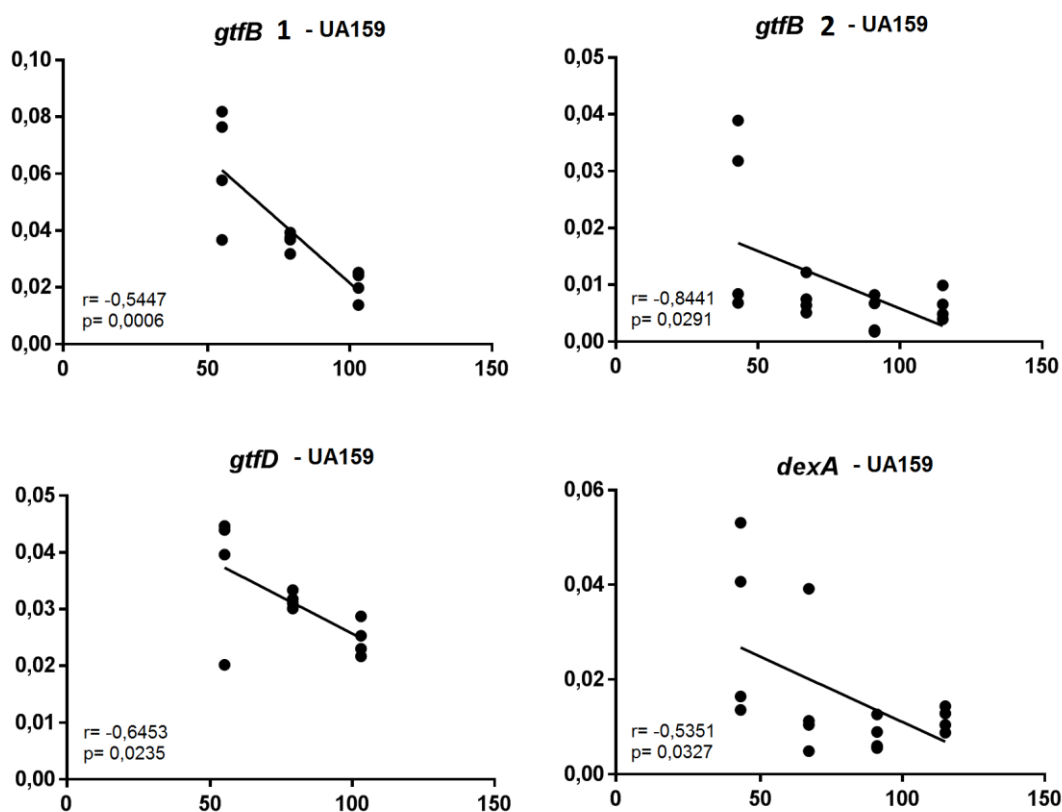
Figura 25 - Expressão dos genes associados a EPS – UA159

Os genes associados com metabolismo de EPS apresentam o pico de expressão gênica em 55h e valores altos quando o meio “fresco” e rico em nutrientes (horários em verde, 2h após a troca do meio). As idades 67, 91 e 115h (horários em azul, após 10h em meio de escassez) registraram os valores mais baixos. Os dados mostrados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão. O eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). As letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas na expressão entre as diferentes idades do biofilme. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria..

No grupo de genes associados a EPS se constatou uma maior expressão em 55h. A expressão diminuiu nos outros períodos onde o meio estava “fresco” (Figura 25): Encontrou-se correlações negativas moderadas para os genes *gtfB* ($r = -0,5447$; $p = 0,0006$) e *gtfD* ($r = -0,6453$; $p = 0,0235$) (Figura 25), fraca para *gtfC* ($r = -0,4812$; $p = 0,1132$), *gbpB* ($r = -0,4203$; $p = 0,1737$) e negligenciável para *dexA* ($r = -0,1297$; $p = 0,6878$). Nos períodos mais ácidos (43, 67, 91 e 115h) também se evidenciou uma diminuição da expressão gênica nos horário de escassez, para o gene *gtfB* uma correlação negativa de intensidade forte ($r = -0,8441$; $p = 0,0291$), para o *dexA* a intensidade foi moderada ($r = -0,5351$; $p = 0,0327$) (Figura 26), para o gene *gtfC* foi fraca ($r \leq 0,5$), e negligenciáveis ($r \leq 0,3$) para os genes *gtfD* e *gbpB* (gráficos não apresentados).

Figura 26 - Correlação entre idade e expressão dos genes associados com EPS – UA159



Os gráficos apresentados mostram as correlações encontradas entre idade (eixo X) e expressão gênica (eixo Y), *gtfB1* corresponde a horários de abundância e *gtfB2* a horários de escassez. São mostrados também os valores de r (coeficiente de correlação) e p (nível de significância estatística). Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Dinâmica de expressão gênica de *S. mutans* Δ gtfB

Para a cepa mutante, o perfil de expressão do grupo de genes associados ao metabolismo de LTA foi semelhante entre eles, com maiores valores nos horários em que o meio era abundante em recursos (55, 79 e 103h) comparados com os períodos de incubação prolongados (29, 43, 67, 91 e 115h), apresentando diferença estatisticamente significativa para os genes *dltA* ($p \leq 0,0002$), *dltB* ($p \leq 0,0003$) e *dltC* ($p \leq 0,0031$) (Figura 27). O gene *SMU_775c* teve o pico de expressão em 55h, sendo similar com 103h, mas diferente de 79h, estes três horários correspondentes ao meio “fresco” e tiveram diferença ao serem comparados com os horários de meio “velho” ($p \leq 0,0405$) (Figura 27).

Figura 27 - Expressão dos genes associados ao metabolismo de LTA – Δ gtfB (Continua)

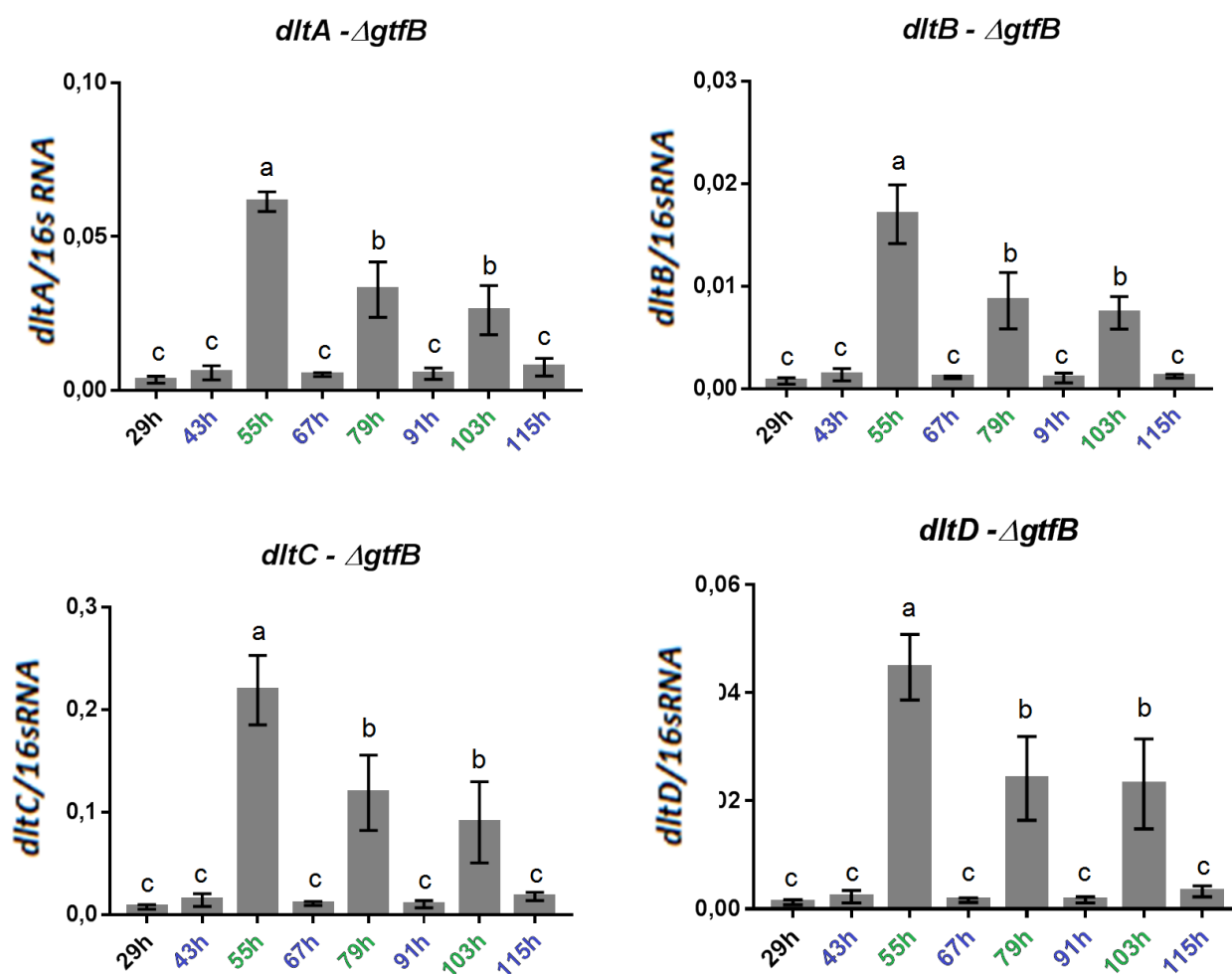
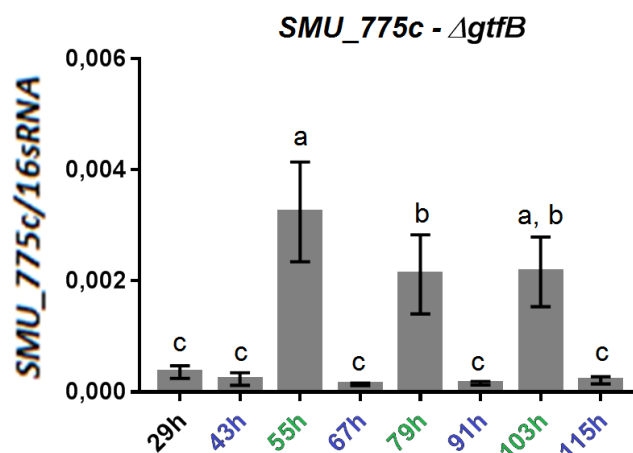


Figura 27 - Expressão dos genes associados ao metabolismo de LTA - *ΔgtfB*.
(Conclusão)

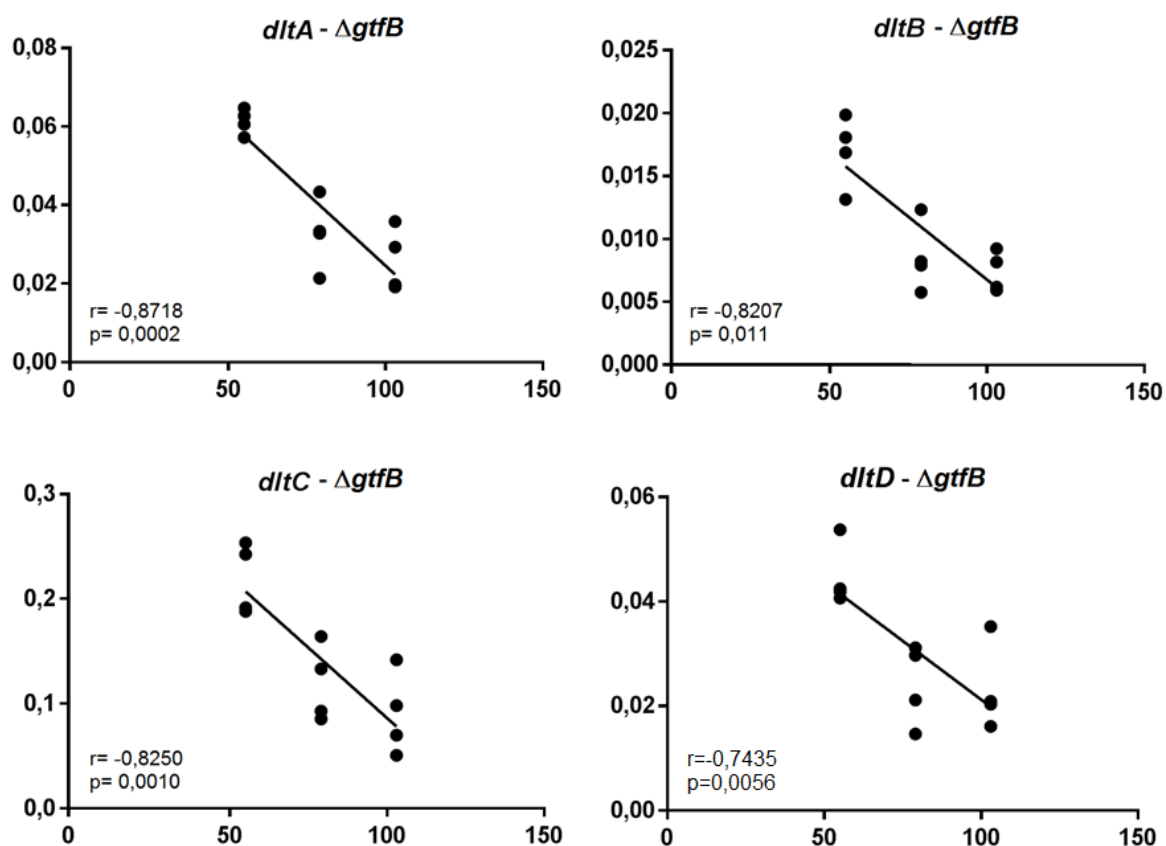


Expressão gênica da cepa *S. mutans ΔgtfB* com relação ao grupo de genes associados ao metabolismo de LTA onde é observada uma maior expressão nos horários em que o meio estava “fresco” (horários em verde) ao comparar com períodos em que o meio estava “velho” (horários em azul). Os dados mostrados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão. O eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). As letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significantes na expressão entre as diferentes idades do biofilme. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Houve uma diminuição na expressão gênica dos genes associados ao metabolismo de LTA na medida em que o biofilme envelhecia, evidenciado pelas correlações negativas fortes encontradas (Figura 28). Essas correlações apresentaram significância estatística para os genes *dltA* ($r = -0,8718$; $p = 0,0002$), *dltB* ($r = -0,8207$; $p = 0,0011$) e *dltC* ($r = -0,8250$; $p = 0,0010$). Porém, para o gene *SMU_775c* ocorreu correlação considerada moderada, mas sem significância estatística ($r = -0,5286$; $p = 0,0772$). Nos períodos “ácidos” as correlações foram fracas para *dltA* ($r \leq 0,5$) e negligenciáveis ($r \leq 0,3$) para *dltB*, *dltC* e *SMU_775c*, sem significância estatística (gráficos não apresentados).

Figura 28 - Correlação entre idade do biofilme e expressão dos genes associados ao metabolismo LTA – $\Delta gtfB$



Os gráficos apresentados mostram as correlações encontradas entre idade (eixo X) e expressão gênica (eixo Y), são expostos também os valores de r (coeficiente de correlação) e p (nível de significância estatística). Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Ao serem analisados os genes relacionados com metabolismo de eDNA (Figura 29) verificou-se que *lrgB* teve a maior expressão quando o biofilme estava incubado no meio por 10 ou mais horas, estes horários foram estatisticamente diferentes aos horários 55, 79 e 103, exceto no caso de 67h ($p \leq 0,0103$). O pico de expressão no *lrgA* foi em 115h e teve semelhança com as idades 43 e 91h, a menor expressão gênica foi em 55h. Esse horário de 55h apresentou similaridade com todos os horários em que o meio de cultura estava “velho” exceto com 43h, os valores em 67h só foram diferentes com os registrados em 115h ($p \leq 0,0402$).

Os genes *lytT* e *ccpA* não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre as idades de crescimento do biofilme ($p > 0,05$). No caso do gene *lytS* detectou-se um pico as 55h tendo diferença significante com os demais horários, os menores níveis de expressão gênica foram detectados quando o meio estava mais “velho”, apresentado diferença com os horários do meio “fresco”, exceto em 103h ($p \leq 0,0495$) (Figura 29).

Figura 29 - Expressão dos genes associados com metabolismo de eDNA – $\Delta gtfB$ (Continua)

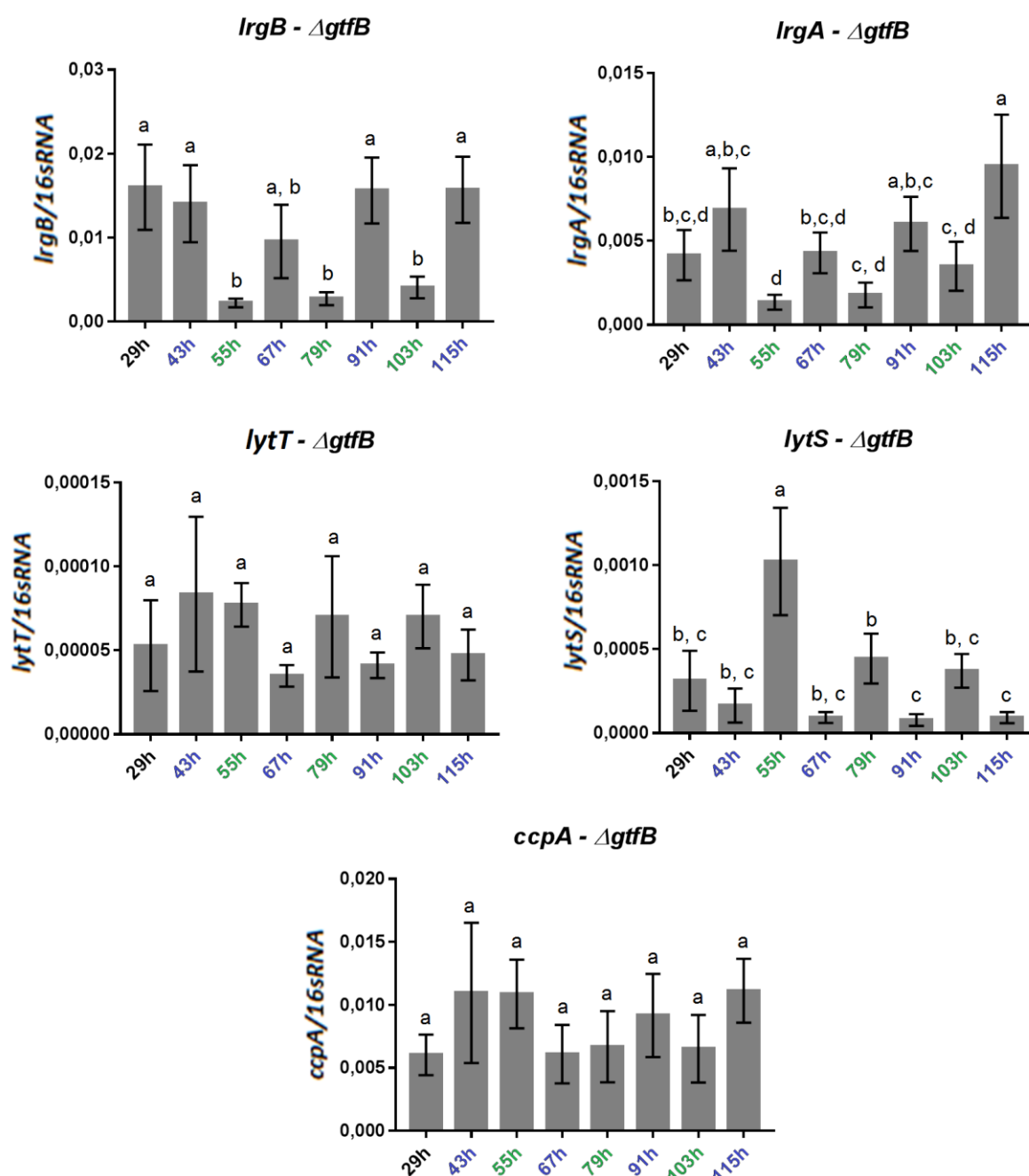


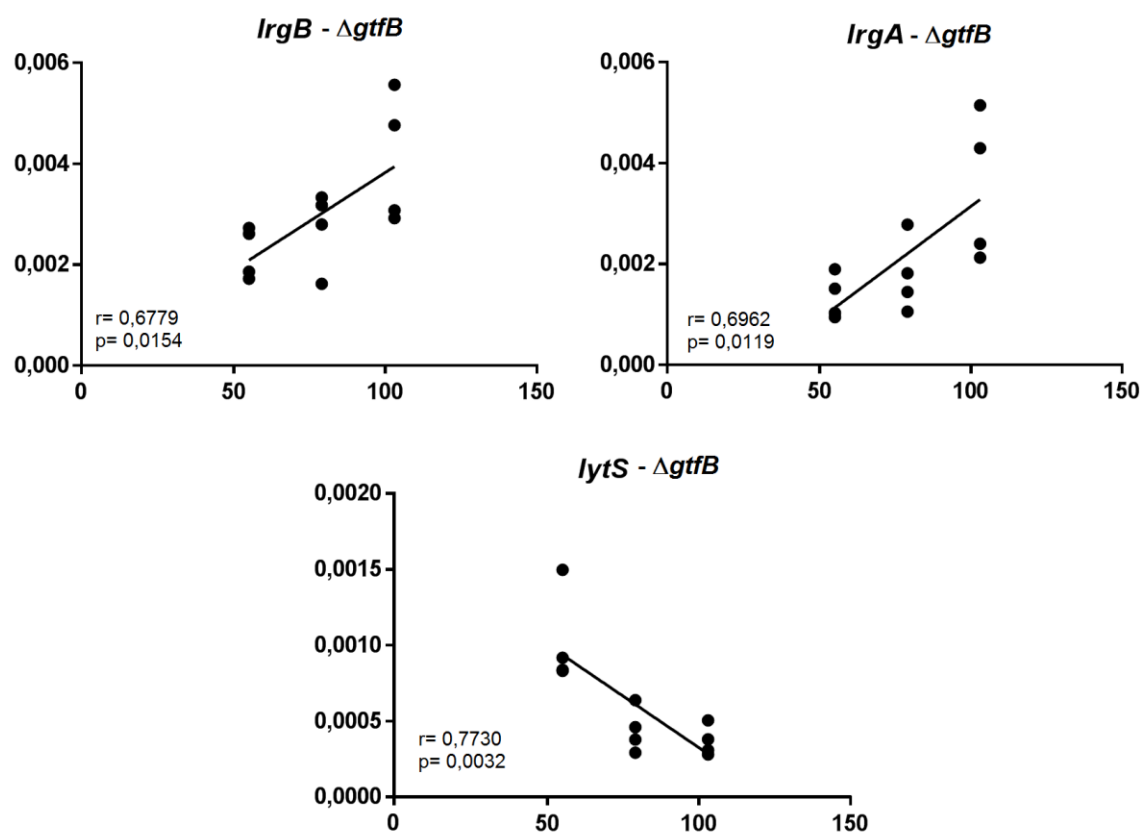
Figura 29 - Expressão dos genes associados com metabolismo de eDNA – $\Delta gtfB$
(Conclusão)

Expressão gênica da cepa *S. mutans* $\Delta gtfB$ com relação ao grupo de genes associados com metabolismo de eDNA. Onde é observada uma menor expressão dos genes *lrgAB* nos horários em que o meio estava “fresco” (horários em verde). Para o gene *lytS* se achou um pico de expressão as 55h e os menores valores foram quando o meio estava “velho” (horários em azul). Os genes *lytT* e *ccpA* tiveram níveis de expressão semelhantes em todas as idades do biofilme. Os dados mostrados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão. O eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). As letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significantes na expressão entre as diferentes idades do biofilme. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

A medida em que o biofilme envelhecia, os níveis de expressão aumentaram nos horários que tinham um pH menos ácido; confirmou-se uma correlação positiva moderada para os genes *lrgB* ($r = 0,6779$; $p = 0,0154$) e *lrgA* ($r = 0,6962$ $p = 0,0119$), e uma correlação negativa forte para o gene *lytS* ($r = -0,7730$ $p = 0,0032$) (Figura 30). Porém para os genes *lytT* e *ccpA* a correlação foi fraca nestes horários. Nos horários mais ácidos as correlações foram negligenciáveis para todos os genes ($r \leq 0,3$) (gráficos não apresentados).

Figura 30 - Correlação entre idade do biofilme e expressão de genes associados ao metabolismo de eDNA



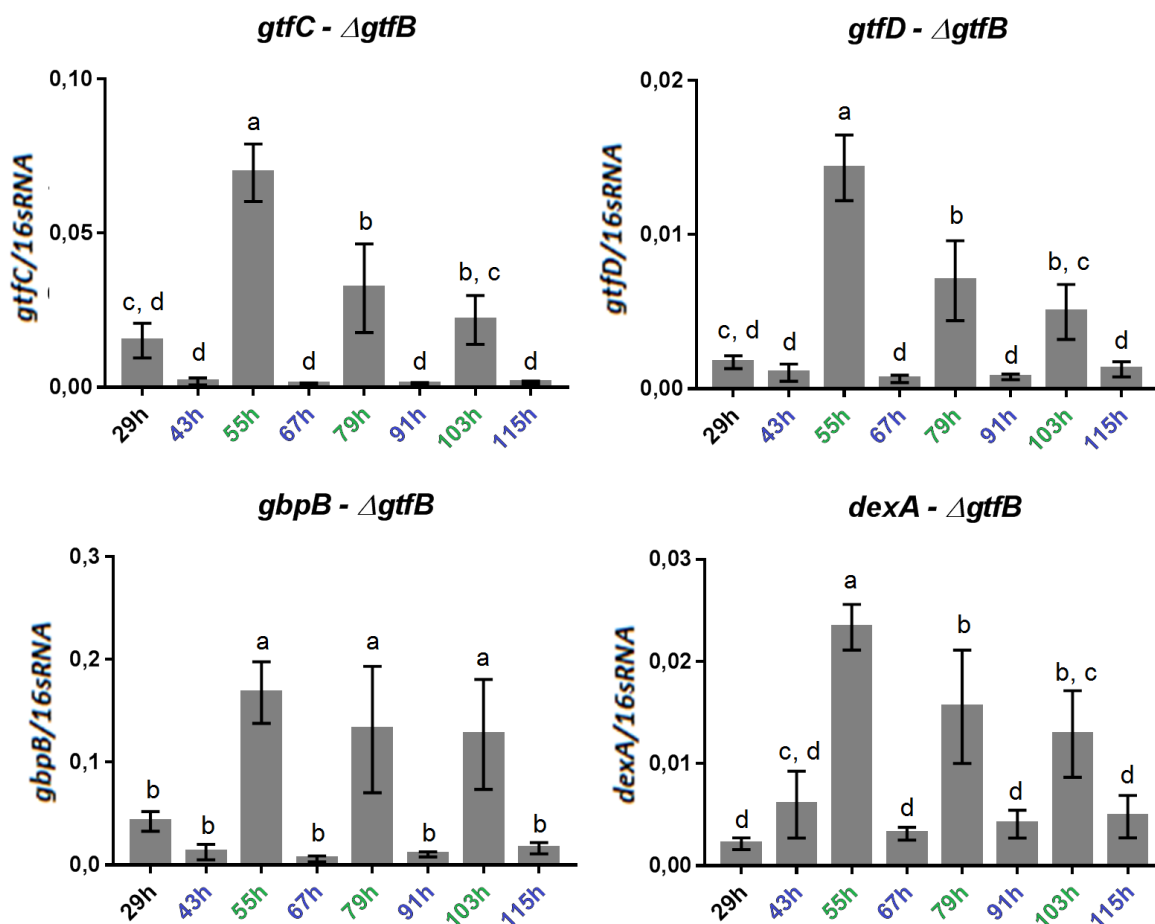
Os gráficos apresentados mostram as correlações encontradas entre idade (eixo X) e expressão gênica (eixo Y), são indicados também os valores de r (coeficiente de correlação) e p (nível de significância estatística). Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

A expressão do grupo de genes associados a síntese, ligação e remodelado de EPS (*gtfC*, *gtfD*, *gbpB* e *dexA*) foi semelhante entre eles, tendo os maiores valores duas horas após serem incubados em meio rico em sacarose e amido, os menores níveis de expressão registraram-se após períodos de incubação prolongados ≥ 10 h (Figura 31). O gene *gtfC* encarregado da síntese de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis apresentou um pico de expressão em 55h, tendo diferença com as demais idades. Em 79 e 103h também ocorreram valores de expressão altos, nos quais o meio estava “fresco”. Os menores valores foram registrados sempre nos horários em que o biofilme se encontrava incubado por períodos prolongados (43, 67, 91 e 115h), existindo diferença estatística com os maiores valores ($p \leq 0,0378$). A expressão gênica em 29h foi semelhante com os

períodos de baixa expressão e com as 103h. O gene *gtfD* teve padrão de comportamento similar ao de *gtfC* ($p \leq 0,0173$).

Figura 31 - Expressão dos genes associados ao metabolismo de EPS - $\Delta gtfB$



Expressão do grupo de genes associados à síntese (*gtfC* e *gtfD*), união (*gbpB*) e remodelação (*dexA*) de EPS. Observa-se uma dinâmica semelhante entre todos eles, com maior expressão 2h após ter fornecido um meio rico em recursos nutricionais (horários em verde), enquanto que os menores valores se registram após incubações por mais de $\geq 10h$ (horário em azul e 29h considerado *baseline*), em que esses recursos já estão escassos. Os dados mostrados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão. O eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). As letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas na expressão entre as diferentes idades do biofilme. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Observando a expressão correspondente a união de glucanos (*gbpB*) detectou-se uma diferença significativa entre os horários em que o meio estava “fresco” (2h de incubação) ao ser comparado com o meio “velho” (incubação $\geq 10h$),

sendo os valores mais altos no primeiro caso ($p \leq 0,0151$). A expressão do gene *dexA* teve os maiores valores quando o biofilme era incubado em meio rico por um período curto (2h), teve um pico as 55h que foi diferente das demais idades, em 79 e 103h registrou-se uma expressão estatisticamente maior do que os períodos em que o meio estava “velho”, exceto ao comparar 43 e 103h ($p \leq 0,0215$).

Nos gráficos da Figura 31 se percebe uma diminuição gradual na expressão entre 55, 79 e 103h, ao serem feitas análises estatísticas se constata uma covariabilidade negativa de intensidade moderada nos genes *gtfC* ($r = -0,863$; $p = 0,0003$), *gtfD* ($r = -0,8591$; $p = 0,0003$) e *dexA* ($r = -0,7419$; $p = 0,0051$), o gene *gbpB* teve correlações negligenciáveis ($r = 0,2985$; $p = 0,2614$) (Figura 32). Ao serem procuradas correlações nos horários mais ácidos encontraram-se valores negligenciáveis ($r \leq 0,3$) para todos os genes exceto para *gtfC* ($r = -0,7208$; $p = 0,0016$).

Figura 32 - Correlação entre idade do biofilme e expressão de genes associados ao metabolismo de EPS (Continua)

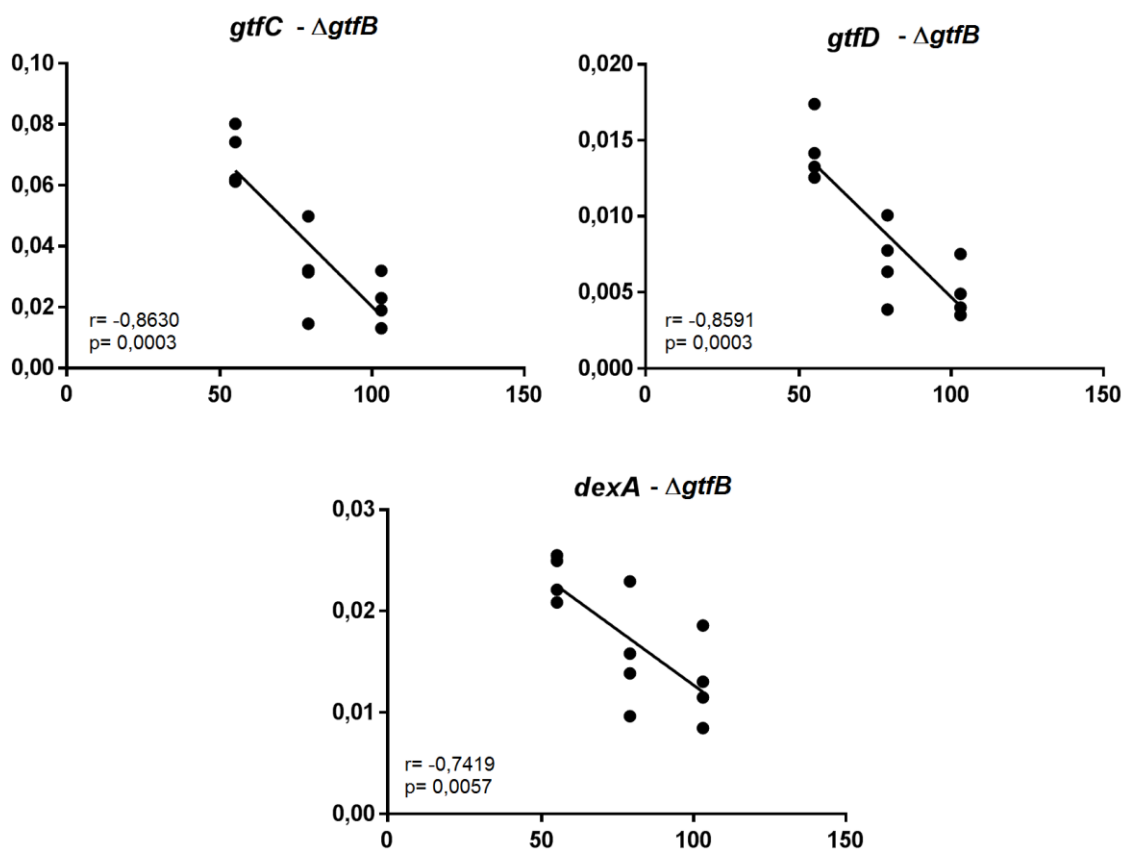


Figura 32 - Correlação entre idade do biofilme e expressão de genes associados ao metabolismo de EPS (Conclusão)

Os gráficos apresentados mostram as correlações encontradas entre idade (eixo X) e expressão gênica (eixo Y), são mostrados também os valores de *r* (coeficiente de correlação) e *p* (nível de significância estatística). Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Comparação da Expressão Gênica entre os Biofilmes Formados pelas Cepas de *S. mutans* Parental UA59 e Mutante $\Delta gtfB$

Efetuuou-se teste de ANOVA a dois fatores para cada gene, além disso, foi feita correlação entre as médias da expressão gênica para confirmar se estavam apresentando a mesma dinâmica (indução e repressão da expressão gênica nos mesmos horários, porém com diferenças de magnitude). Os gráficos foram organizados por grupos de genes, dependendo da sua função (LTA, eDNA e EPS), mostrando do lado esquerdo a análise de variância (os asteriscos representam diferença estatística entre os grupos experimentais) do lado direito as correlações (os valores do coeficiente de correlação e o nível de significância estão em cada gráfico).

O comportamento do grupo de genes associado ao metabolismo de LTA apresentou uma semelhança na dinâmica para as duas cepas, tendo correlações positivas muito fortes para *dltA* ($r = 0,956$ $p = 0,0002$), *dltB* ($r = 0,96$ $p = 0,0002$), *dltC* ($r = 0,9429$ $p = 0,0004$) *dltD* ($r = 0,9487$ $p = 0,003$) e *SMU_775c* ($r = 0,9226$ $p = 0,0011$) (Figura 33). Numericamente identificaram-se diferenças, para o gene *dltA* onde a cepa $\Delta gtfB$ demonstrou uma expressão ligeiramente menor, mas a diferença foi estatisticamente significativa apenas em 79h ($p = 0,0117$). Para o gene *dltB* a diferença numérica foi maior sendo significantes em 43, 55, 79 e 103h ($p \leq 0,0008$). Os valores de expressão foram diferentes em 43h para os genes *dltD* ($p = 0,0141$) e *SMU_775c* ($p = 0,0352$) (Figura 33).

Figura 33 - ANOVA a dois fatores da expressão dos genes associados a LTA e correlação entre a dinâmica de expressão dos biofilmes formados pelas duas cepas de *S. mutans* (Continua)

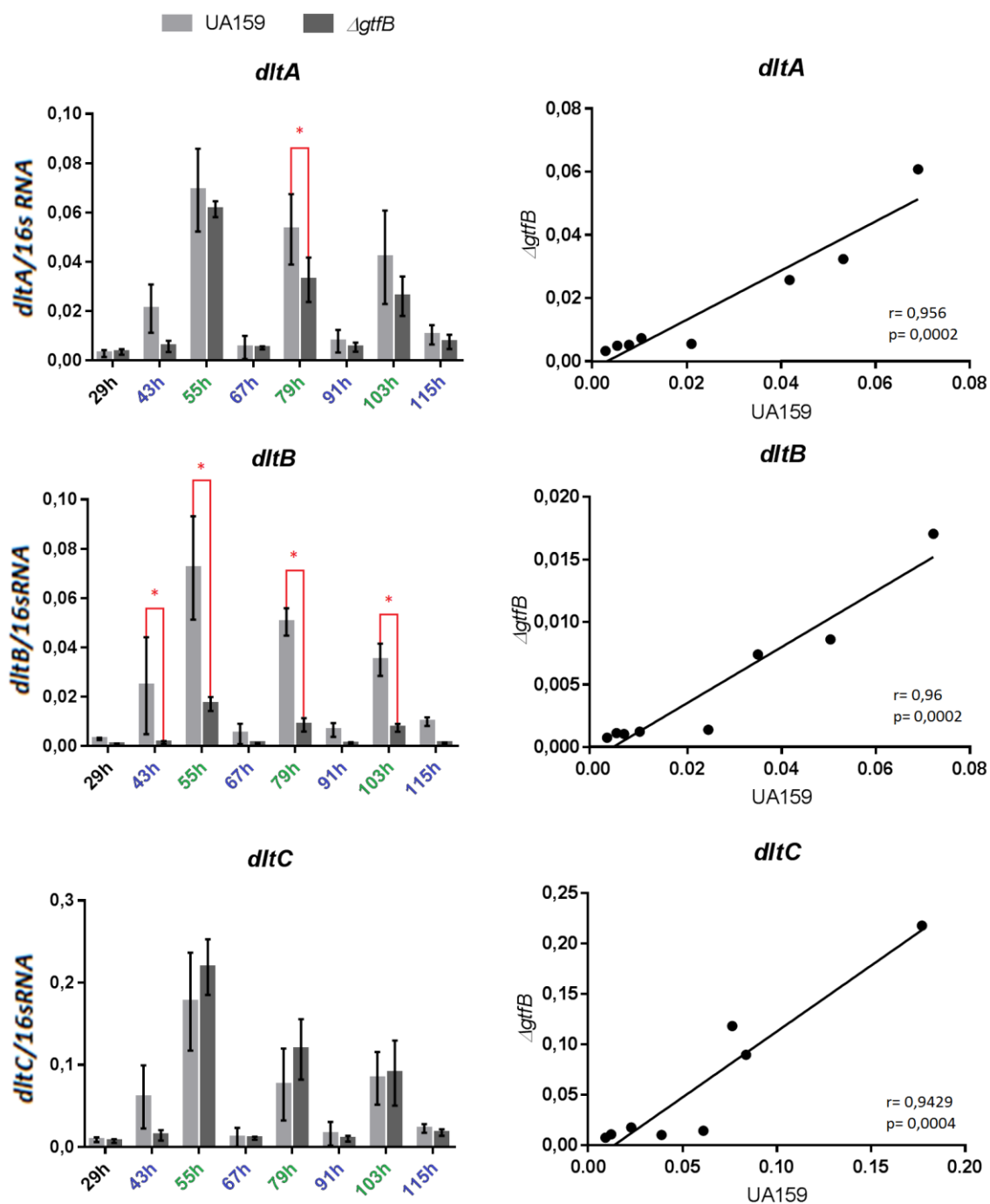
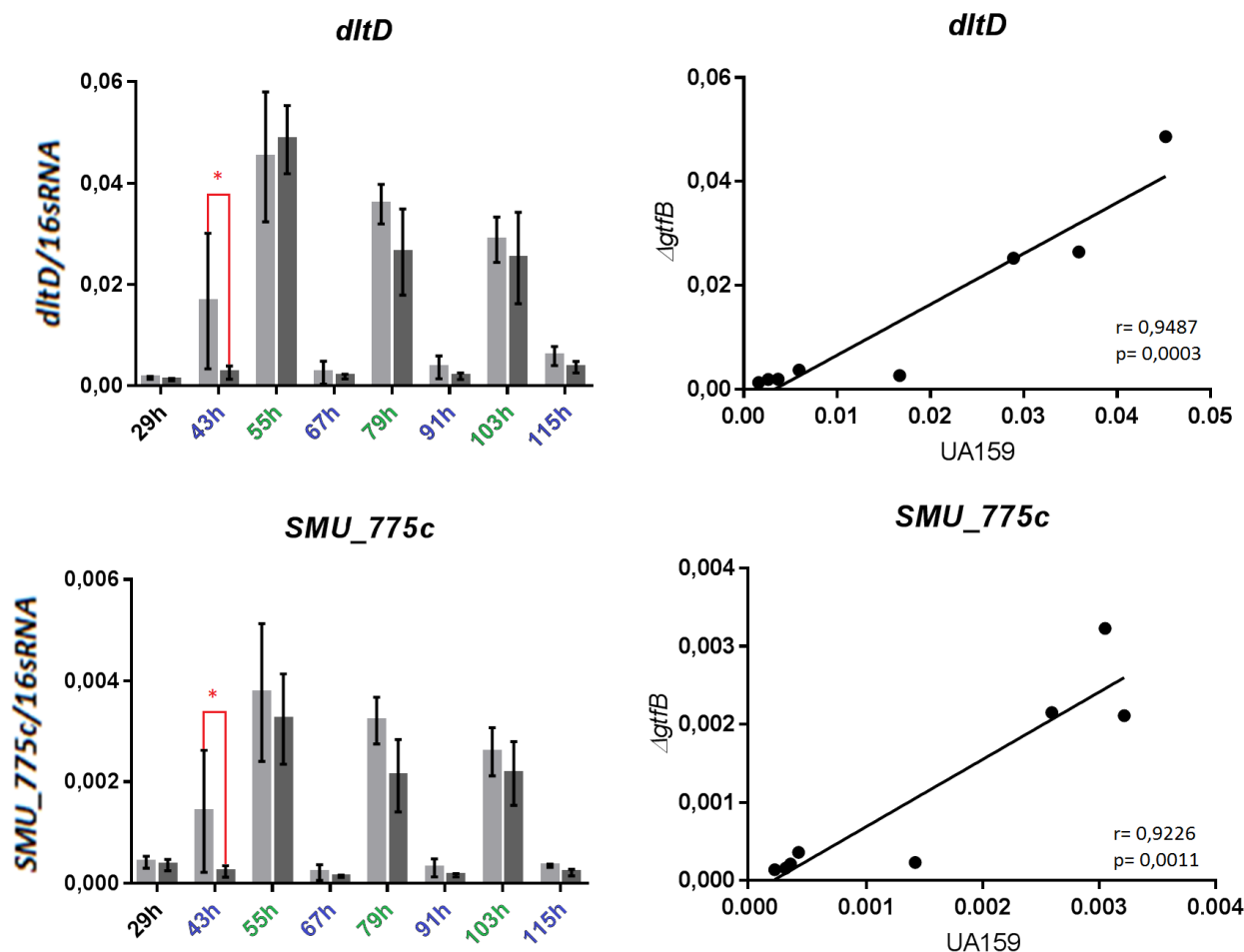


Figura 33 - ANOVA a dois fatores da expressão dos genes associados a LTA e correlação entre a dinâmica de expressão dos biofilmes formados pelas duas cepas de *S. mutans* (Conclusão)



Evidenciou-se uma dinâmica de expressão gênica semelhante entre os grupos experimentais (cinza claro UA159 e cinza escuro $\Delta gtfB$). Esta semelhança foi confirmada mediante correlações positivas muito fortes, algumas idades do biofilme apresentaram diferenças estatísticas (representadas com um asterísco) entre os dois grupos. Nos gráficos mostrados no lado esquerdo, os dados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão; o eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). Em azul estão representado os horários em que o meio estava “velho” (10h após incubação em meio de escassez) e em verde os horários em que o meio estava “fresco” (2h após incubação em meio de abundância). O asterísco mostra onde ocorreram diferenças estatisticamente significantes na expressão entre o biofilme da cepa parental UA159 e a cepa mutante $\Delta gtfB$. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

O operon encarregado da remodelação da parede celular e da autólise contava com um pico de expressão em 29h na cepa parental, no caso da mutante

este não foi detetado, dando como resultado uma diferença significativa entre os biofilmes, para o *lrgB* ($p < 0,0001$) com correlação fraca ($r = 0,4363$; $p = 0,2795$) e para *lrgA* ($p < 0,0001$) com correlação negligenciável ($r = 0,1306$; $p = 0,7579$) (Figura 34). Com a intenção de detetar diferenças de menor escala removeram-se da análise estatística os dados correspondentes ao horário de 29h. Na cepa mutante evidenciaram-se menores valores nos horários em que o meio tinha abundância de recursos; para *lrgB* a diferença foi significativa em 55h ($p = 0,0288$) e apresentou uma correlação positiva moderada, porém sem significância ($r = 0,6251$; $p = 0,1333$); o mesmo comportamento foi obtido para *lrgA* ($p \leq 0,0036$) e uma covaribilidade fraca ($r = -0,412$; $p = 0,3584$) (Figura 34).

Figura 34 - ANOVA a dois fatores da expressão dos genes *IrgAB* associados a autólise (liberação de eDNA) e correlação entre a dinâmica dos dois biofilmes (Continua)

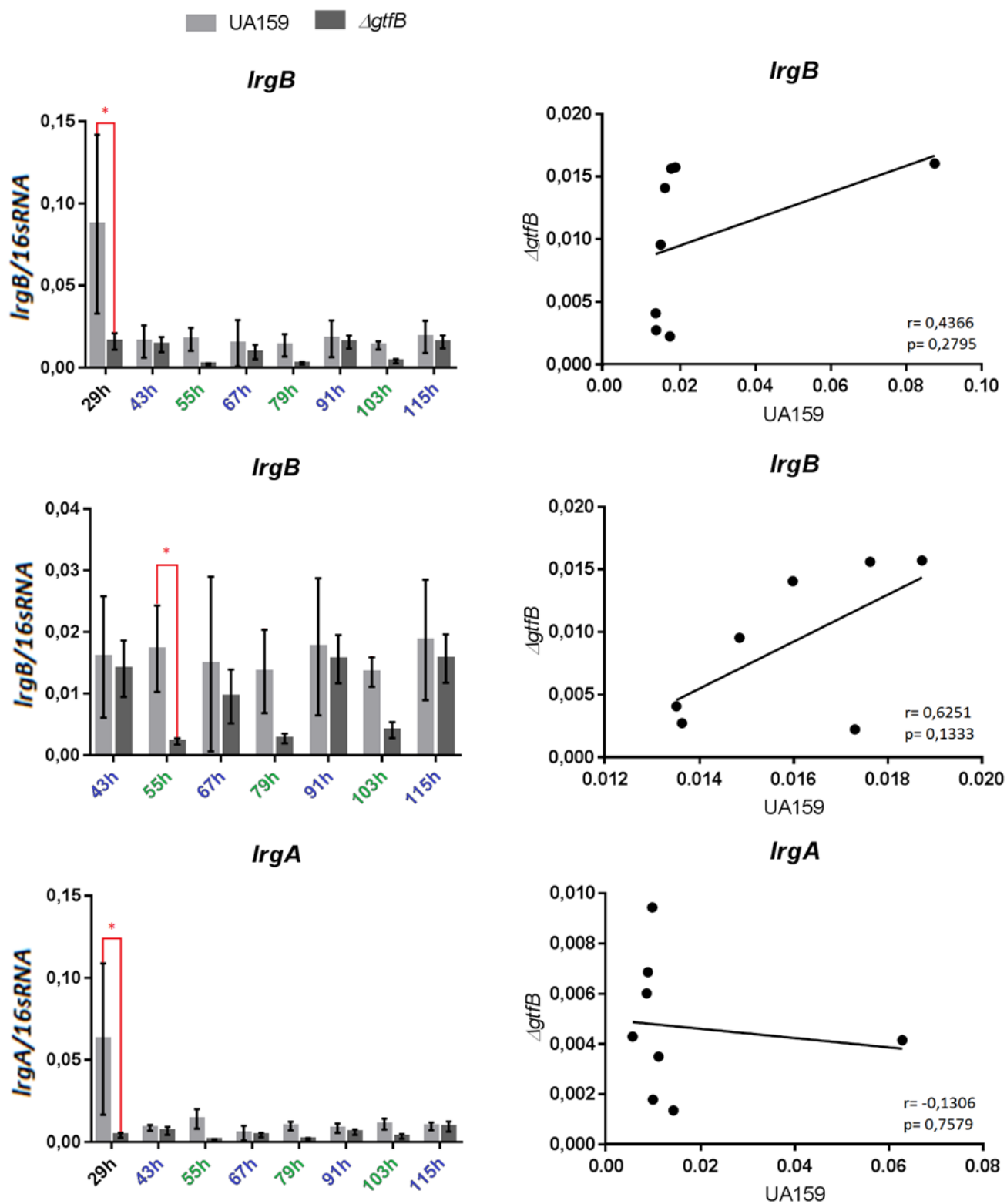
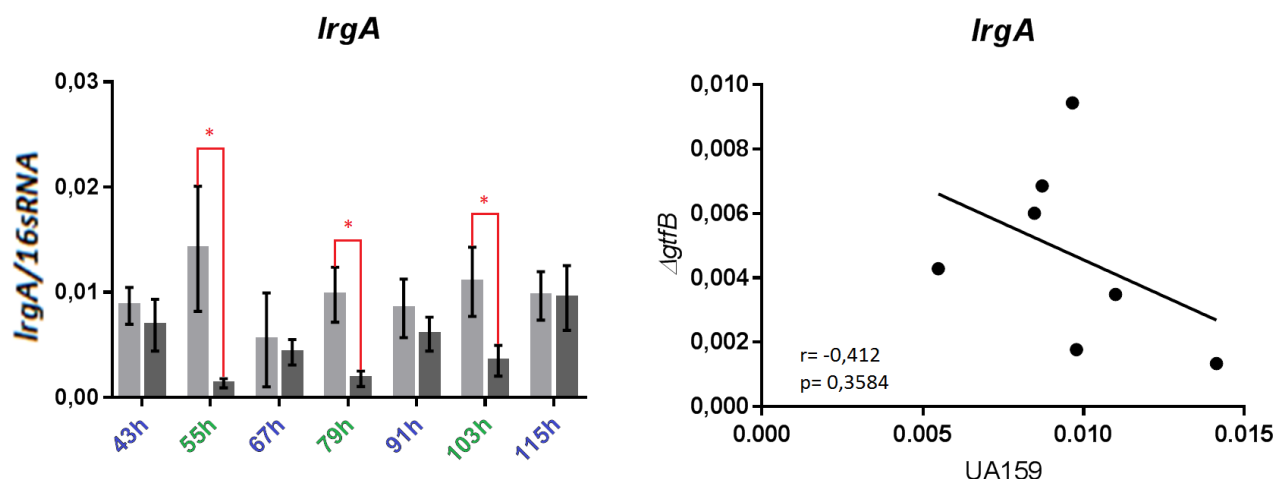


Figura 34 - ANOVA a dois fatores da expressão dos genes *lrgAB* associados a autólise (liberação de eDNA) e correlação entre a dinâmica dos dois biofilmes (Conclusão)

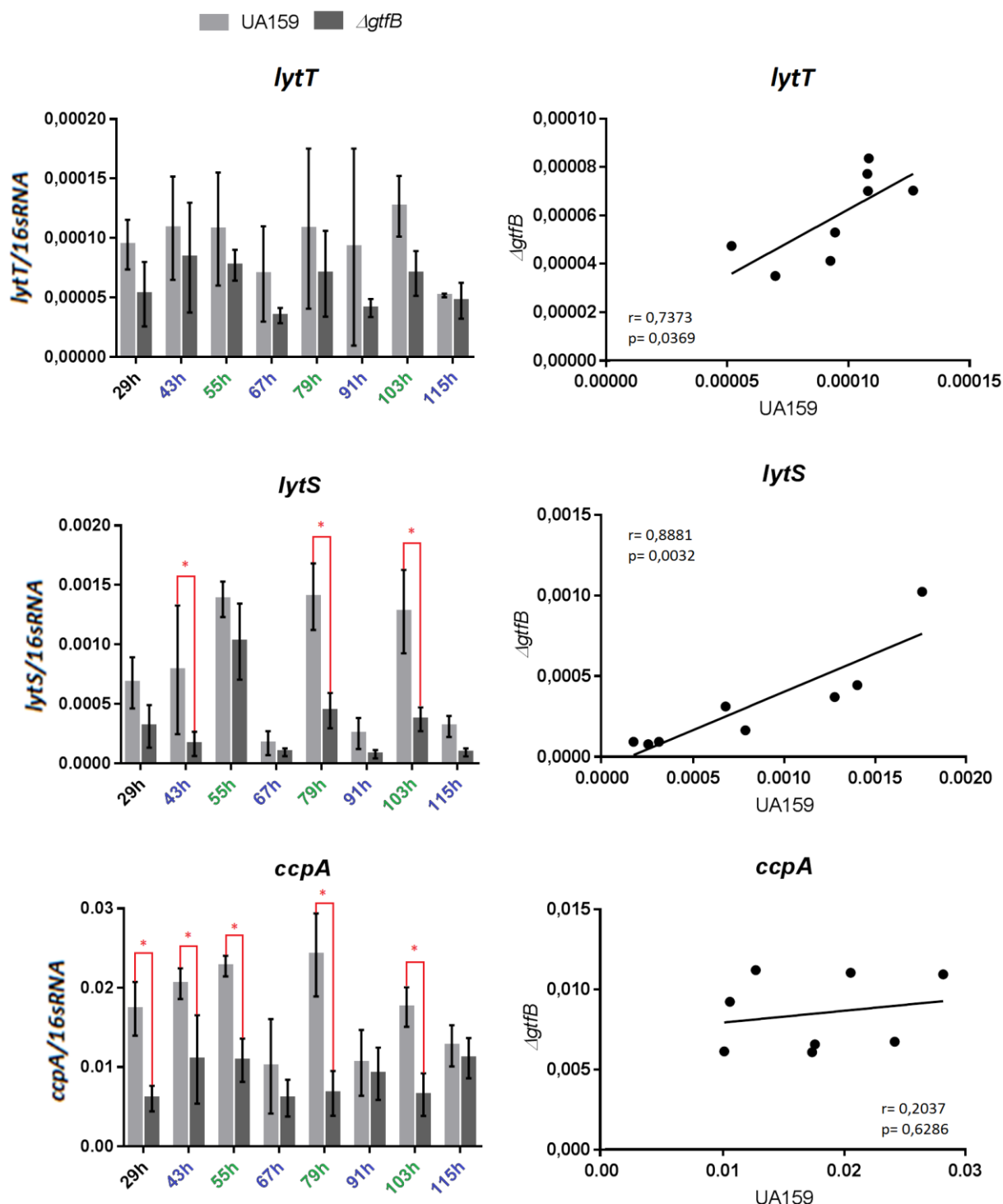


A dinâmica de expressão genica foi diferente entre grupos experimentais e não tiveram covaribilidade (cinza claro UA159 e cinza escuro $\Delta gtfB$). Inicialmente só tinham diferença em 29h, mas após remoção deste horário se descobriram diferenças estatisticamente significantes em 55, 79 e 103h entre as duas cepas. Nos gráficos mostrados no lado esquerdo, os dados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão; o eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). Em azul estão representado os horários em que o meio estava “velho” (10h após incubação em meio de escassez) e em verde os horários em que o meio estava “fresco” (2h após incubação em meio de abundância). O asterísco mostra onde ocorreram diferenças estatisticamente significantes na expressão entre o biofilme da cepa parental UA159 e a cepa mutante $\Delta gtfB$. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

O gene *lytT* apresentou os menores valores do estudo e não se acharam diferenças entre as idades, este padrão foi consistente nos dois grupos (cepa parental UA159 e cepa mutante $\Delta gtfB$), tendo uma correlação positiva forte ($r = 0,7373$; $p = 0,0369$) (Figura 35). O gene *lytS* teve maior expressão duas horas após fornecimento de sacarose e o amido nos dois biofilmes tendo uma correlação positiva moderada ($r = 0,881$; $p = 0,0032$), e diferenças significantes foram encontradas em 43, 79 e 103h ($p \leq 0,0310$) (Figura 35). O gene *ccpA* teve uma correlação negligenciável ($r = 0,2037$; $p = 0,6286$) e diferença de expressão nos horários 29, 43, 55, 79 e 103h entre as duas cepas ($p \leq 0,0265$) (Figura 35).

Figura 35 - ANOVA a dois fatores da expressão dos sistemas reguladores *lytST* e *ccpA* (associados a eDNA) e correlação entre a dinâmica dos dois biofilmes (Continua)



Nos gráficos mostrados no lado esquerdo, os dados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão; O eixo Y mostra a expressão gênica do gene de interesse normalizado pelo controle do rRNA 16S (em número de cópias). Em azul são representados as idades em que o médio estava "velho" (10h após incubação em médio de escassez) e em verde nos momentos em que o meio estava "fresco" (2h após incubação em abundância). Foi realizado ANOVA two-way seguido do pós-teste de Sidak para comparar a

Figura 35 - ANOVA a dois fatores da expressão dos sistemas reguladores *lytST* e *ccpA* (associados a eDNA) e correlação entre a dinâmica dos dois biofilmes (Conclusão)

expressão gênica entre o biofilme da cepa parental UA159 (cinza claro) e a estirpe mutante $\Delta gtfB$ (cinza escuro). Os níveis de expressão mais baixos do estudo correspondem a *lytT*, quem não apresentou diferença em idades ou cepa de biofilme. Observou-se similaridade ao comparar a expressão de *lytS* em ambos os biofilmes, devido a magnitude da expressão gênica se observaram diferenças ($P \leq 0,0310$) em algumas idades, foram marcadas com um asterisco. Por outro lado, o gene *ccpA* apresentou diferenças ($P \leq 0,0265$) entre ambos tipos de biofilmes em várias idades, e sua dinâmica de expressão foi diferente, tendo uma correlação insignificante. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Os comportamentos dos genes associados com a síntese de EPS apresentaram correlações positivas entre os grupos experimentais (Figura 35), muito forte para o gene *gtfC* ($r = 0,9656$; $p < 0,0001$), que apresentou diferença entre os horários 43, 55, 79 e 103h ($p < 0,0001$). Para *gtfD* a correlação também foi forte ($r = 0,9205$; $p = 0,0012$), e a expressão em 67, 79 e 115h foi considerada semelhante. O gene encarregado da ligação de glucanos (*gbpB*) também teve correlação positiva muito forte ($r = 0,9656$; $p < 0,0001$), com diferença entre os horários 43, 55, 79 e 103h ($p \leq 0,0012$). Para o gene *dexA* encarregado de remodelagem de glucanos a correlação foi forte ($r = 0,8675$; $p = 0,053$), e diferença de expressão entre os biofilmes ocorreram nos horários 43, 55, 79 e 103h ($p \leq 0,0212$) (Figura 36).

Figura 36 - ANOVA a dois fatores da expressão dos genes associados a EPS e correlação entre a dinâmica dos dois biofilmes (Continua)

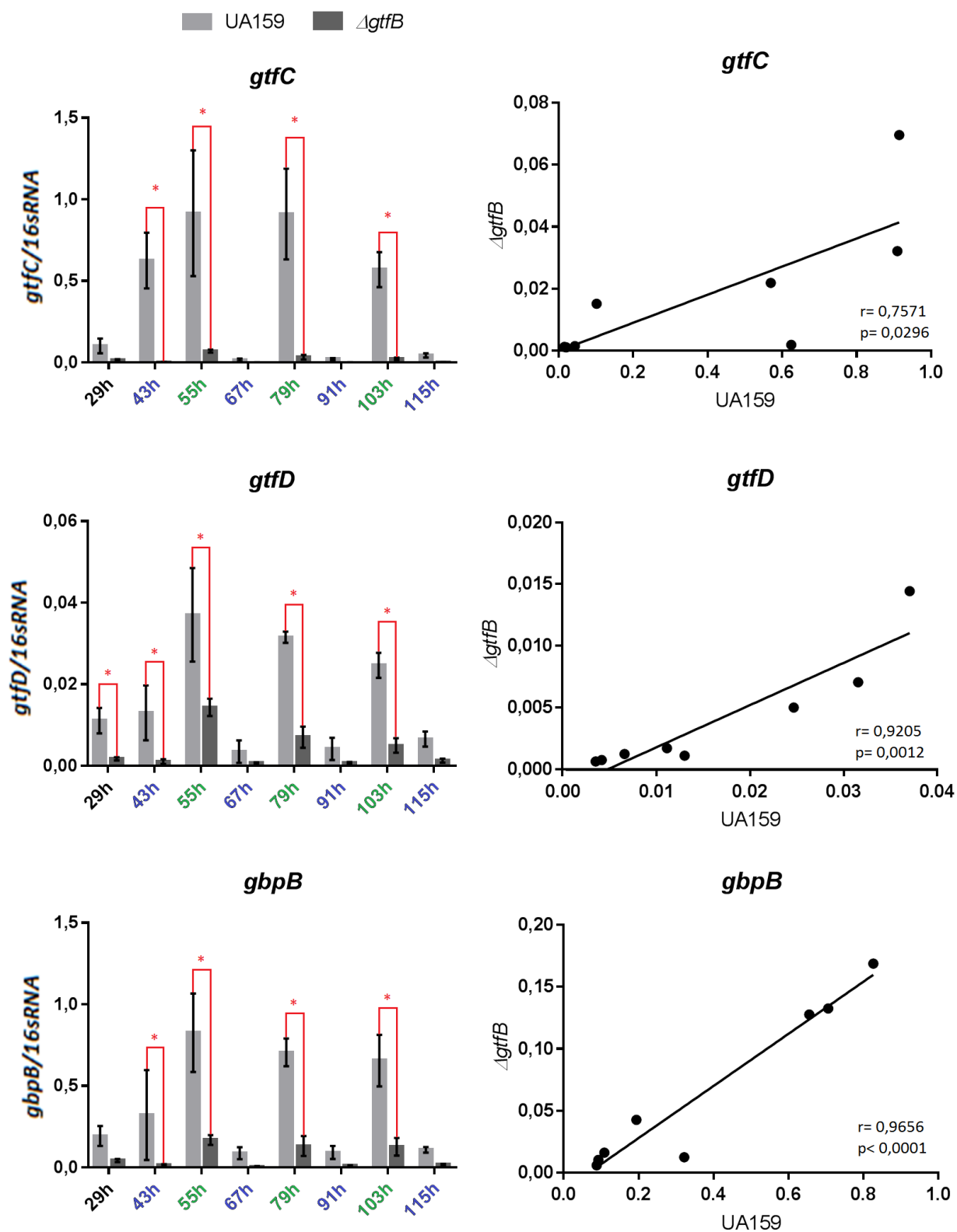
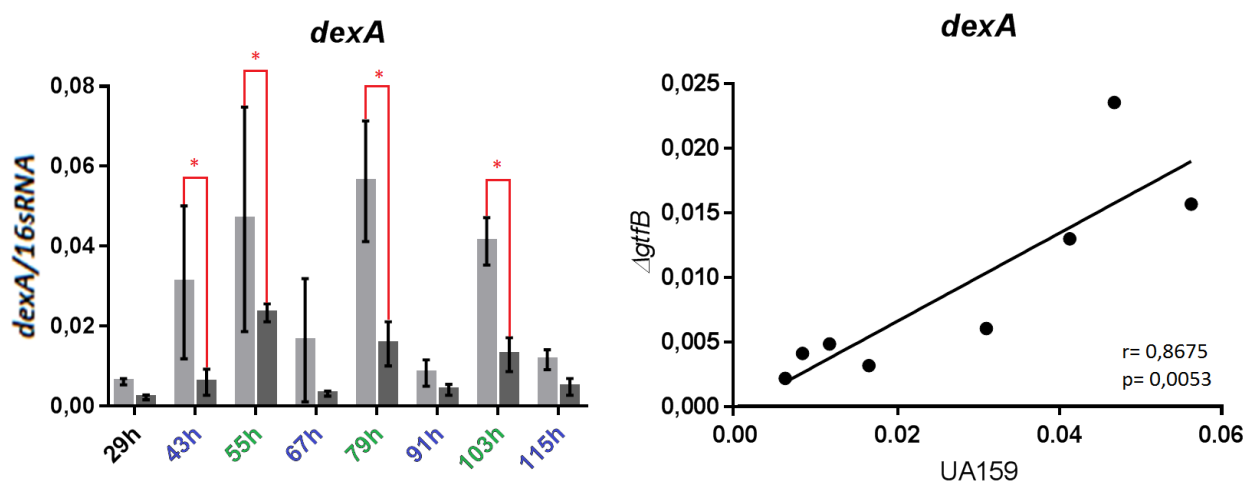


Figura 36 - ANOVA a dois fatores da expressão dos genes associados a EPS e correlação entre a dinâmica dos dois biofilmes (Conclusão)



As duas cepas tiveram um comportamento semelhante na expressão dos genes associados ao metabolismo de EPS, sendo demonstrado mediante correlações forte e muito fortes (cinza claro UA159 e cinza escuro $\Delta gtfB$). De forma geral detectou-se diferença entre os grupos nos horários 43, 55, 79 e 103h. Nos gráficos mostrados no lado esquerdo, os dados são as médias e as barras de erro indicam desvio padrão; o eixo Y apresenta expressão gênica do gene de interesse normalizada pelo controle 16S rRNA (em número de cópias). Em azul estão representado os horários em que o meio estava “velho” (10h após incubação em meio de escassez) e em verde os horários em que o meio estava “fresco” (2h após incubação em meio de abundância). O asterísco mostra onde ocorreram diferenças estatisticamente significantes na expressão entre o biofilme da cepa parental UA159 e a cepa mutante $\Delta gtfB$. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A cavidade bucal fornece as condições necessárias para o desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos complexos (mais de 700 espécies) ¹⁶¹, mas devido à interação de muitos fatores, o esclarecimento da função de cada microrganismo e de sua verdadeira relação com as doenças bucais fica complicado. Estudos in vitro de células planctônicas facilitam o entendimento das características e comportamentos de alguns microrganismos de interesse específico, porém se afastam um pouco das condições clínicas. A simulação de biofilmes mistos (comunidades polimicrobianas) consegue o equilíbrio entre estas duas abordagens, facilitando o entendimento do comportamento dos biofilmes, das relações existentes entre as diferentes espécies e do comportamento sob diferentes desafios. Ainda, a cavidade bucal é um habitat que gera muitos desafios para os microrganismos.

A disponibilidade de recursos nutricionais pode ser determinante para o sucesso ou fracasso de muitas espécies, por isso foi de interesse submeter os biofilmes a diferentes condições ambientais enquanto estavam em desenvolvimento. A presença de sacarose e amido (nutrientes amplamente consumidos na dieta moderna) fornece os nutrientes para o metabolismo dos microrganismos e substratos necessários para a elaboração de substâncias poliméricas que compõem a MEC ³⁶. *S. mutans* tem um arsenal de genes que podem contribuir nesta tarefa ⁷⁹. A importância deste microrganismo na constituição da MEC está evidenciada já que todos os genes de *S. mutans* de interesse no estudo foram expressos durante as diferentes idades do biofilme, tendo diversos níveis de expressão e diferentes comportamentos. Sobretudo, a deleção do gene *ΔgtfB* afetou a dinâmica da expressão de genes associados com eDNA além de diminuir a expressão dos genes associados com síntese, ligação e remodelação de EPS.

Nos horários de adesão e fase inicial de formação dos biofilmes a diminuição do pH chegou a valores entre 5,5 e 6,0 (inicialmente o pH do meio de cultura era neutro), após da primeira troca com sacarose e amido (as 29h) observa-se uma mudança (ao ser avaliado em 43h) favorecendo as espécies mais acidúricas. De forma geral, os valores de pH do meio de cultura dos dois biofilmes estudados tiveram longitudinalmente a mesma dinâmica, momentos mais ácidos (<4,5) depois de 14h de incubação na presença de sacarose 0,5% e amido 1% (Figura 20), são valores de pH considerados críticos para desmineralização do esmalte dentário ¹⁷.

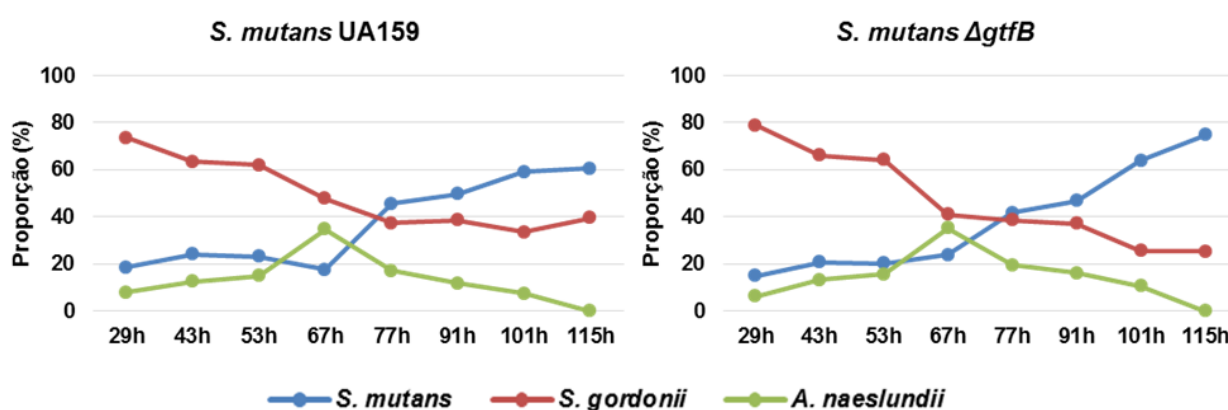
Quando os biofilmes eram incubados em médio de cultura com 0,1% de sacarose (escassez) tinha-se uma menor disponibilidade de recursos, o que resultava numa menor produção de ácidos orgânicos como produtos metabólicos (Figura 20). Nestes horários (29, 53, 77, e 101h) observa-se uma diminuição gradativa no pH das duas cepas conforme o biofilme envelhece (Figura 21). Ainda a deleção do gene *gtfB* diminui a produção de EPS, modificando a patogenicidade do microrganismo^{22, 82}. Isso pode ser refletido nas diferenças do pH entre as duas cepas (registraram-se pH mais ácidos nos biofilmes UA159, Figura 20), resultados semelhantes já foram demonstrado em estudos anteriores^{82, 89, 167, 176}. Num período de duas horas após fornecimento de sacarose e amido (55h, 79h e 103h) registrou-se uma queda do pH, passando de 7,0 para valores inferiores a 5,5.

Essa modulação de pH pela dieta fornecida pode estar relacionada com a expressão gênica de *S. mutans*, pois na análise da população microbiana realizada anteriormente para o mesmo modelo de biofilme, ocorre um aumento gradativo da proporção de *S. mutans* em detrimento das outras duas espécies, tornando-se a espécie dominante após de desenvolvimento de 115hs, independentemente da deleção do gene *gtfB* na cepa Δ *gtfB*²² (Figura 37). Esse sucesso de *S. mutans* pode estar associado à sua versatilidade e adaptabilidade às condições ambientais em que o biofilme se desenvolve, e esse processo é resultado da expressão coordenada de genes para sua sobrevivência e expressão de virulência. Para discutir os resultados da dinâmica da expressão gênica se dividiu em grupos funcionais de acordo com os três principais componentes da MEC.

Os LTA extracelulares (provenientes principalmente da remodelagem da parede celular) podem contribuir na formação da MEC de biofilmes cariogênicos, mas atualmente não está bem esclarecido exatamente como^{19, 33}. Todos os genes envolvidos no processo de incorporação de D-alanina na parede celular de *S. mutans* avaliados foram expressos em todas as idades do biofilme¹¹¹, tendo um padrão de expressão longitudinal similar entre eles (Figura 33). A maior expressão desses genes foi duas horas após exposição à sacarose e amido (55, 79 e 103h), sendo simultâneo ao crescimento e divisão bacteriana (para aumento progressivo da população de *S. mutans*), que levam ao maior desenvolvimento do biofilme durante os períodos de abundância de recursos nutricionais e substratos para síntese de MEC. Evidenciaram-se maiores valores de expressão para a cepa UA159 com diferença significativa (para *dltB*, *dltD* e *SMU_775c*) nos níveis de expressão em 43h

quando comparados com biofilme $\Delta gtfB$. Porém, ao serem comparados os horários em cada cepa separadamente, evidenciou-se que em 43h apresentava semelhança com os horários de menor expressão, correspondentes a um meio “velho” (43, 67, 91 e 115h) tanto para a cepa parental UA159 (Figura 22) quanto para a cepa $\Delta gtfB$ (Figura 27), devido a uma alta variabilidade no horário de 43h no biofilme UA159.

Figura 37 - Dinâmica da população em várias fases de formação de biofilmes mistos



Análise longitudinal da população das diferentes espécies. As cepas utilizadas são as mesmas do presente estudo.

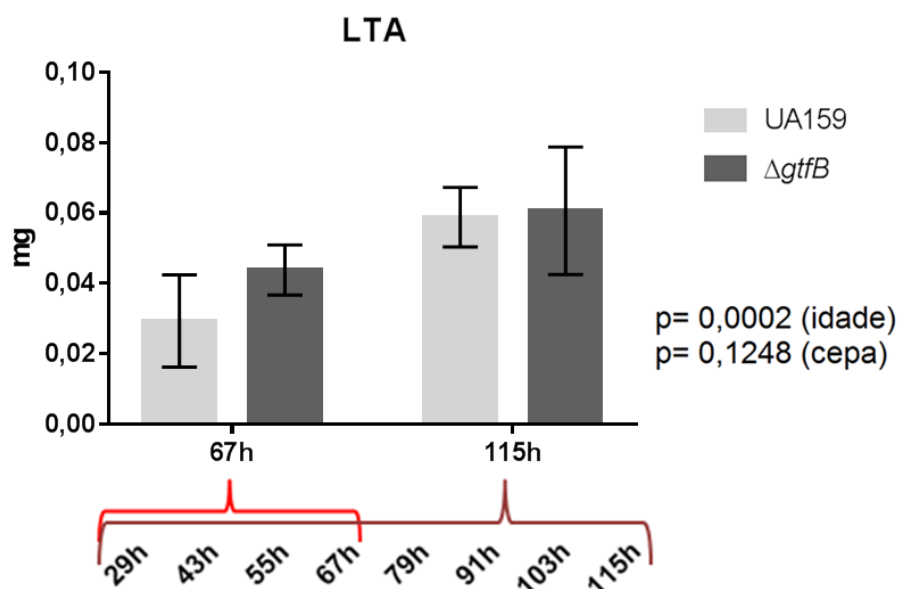
Fonte: Castillo²², 2016.

Os genes do operon *dltABCD* além de apresentarem um perfil de expressão similar entre as cepas, apresentaram níveis de expressão gênica muito semelhantes, exceto no gene *dltB*, que apresento várias diferenças estatísticas por conta da magnitude de expressão, isto demonstra uma possível associação entre o produto do gene *gtfB* e o canal configurado por *dltB* para a secreção de LTA¹¹¹. Entretanto, o gene *SMU_775c* que codifica uma proteína hipotética em *S. mutans* homóloga a LtaS em *S. aureus*⁷⁹, teve os menores valores de expressão nesse grupo de genes, e isso ocorreu porque esse gene pode ser um gene constitutivo que é expresso em baixa quantidade independentemente da idade dos biofilmes.

Em estudo anterior que quantificou LTA na MEC, usando cada biofilme retirado do disco (i.e., os depósitos totais de LTA que se tinham formando longitudinalmente), observou-se um aumento significativo na quantidade de 67 para 115h²² (Figura 38). Paradoxalmente, no presente estudo se observou uma diminuição progressiva da expressão gênica do operon *dltABCD* nos períodos em que o biofilme estava dentro de um meio de cultura “fresco” (confirmado pelas

correlações Figuras 23 e 28). O aumento na quantificação do LTA em 115h foi o somatório do produzido durante todos os períodos anteriores, enquanto a expressão gênica podia estar sendo afetada de forma inversamente proporcional com a idade do biofilme. Esse fenômeno ocorre porque quanto mais madura e estável está a MEC, a difusão no ambiente do biofilme torna-se mais difícil, e os nutrientes e substratos não conseguem entrar, e assim propicia-se crescimento e divisão bacteriana na camada mais externa do biofilme^{18, 39}.

Figura 38 – LTA na MEC dos biofilmes mistos



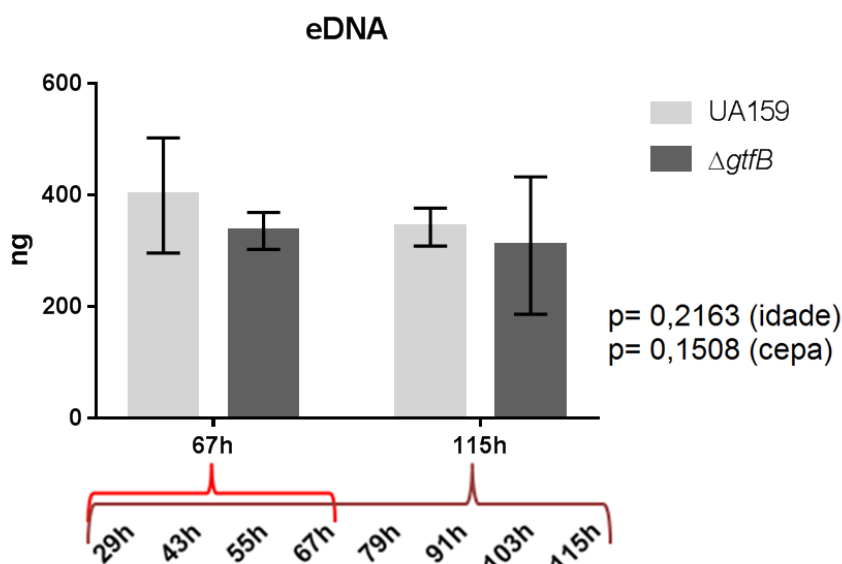
Ao comparar as idades 67 e 115h observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0002$, ANOVA *two way* seguido de post-test de Sidak's), sendo maior para o horário de 115h. Os dados representados são médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad

Fonte: Adaptado de Castillo²², 2016.

Os genes *lrgA* e *lrgB* (associados com autólise)⁴ tiveram um comportamento e valores semelhante entre eles, porém entre as duas cepas foi diferente. O operon *lrgAB* teve uma alta expressão na cepa parental em 29h, o que não coincidiu com a cepa mutante. A expressão após este horário também foi discrepante já que na cepa parental os demais horários foram semelhantes, mas na mutante os menores valores se registraram em 55, 79, e 103 h. Porém estas diferenças na dinâmica de expressão parecem não refletir na quantificação do eDNA dentro da MEC, pois em estudo anterior não existiu diferença entre os valores em 67 e 115h para ambas

cepa parental e cepa mutante em biofilmes mistos ²² (Figura 39). Porém, em biofilmes monoespécies de UA159 e $\Delta gtfB$ ocorreram diferenças nas quantidades de eDNA na MEC entre as cepas em 67 e 115 h ²², mostrando que em biofilmes mistos a ausência de diferença nas quantidades de eDNA pode ocorrer porque as duas outras espécies também fornecem eDNA. Assim, essa diferença na expressão de *lrgAB* de *S. mutans* entre a cepa parental e a cepa mutante $\Delta gtfB$ em biofilmes mistos pode estar relacionada a diferentes processos metabólicos que afetam a remodelagem da parede celular.

Figura 39 – eDNA na MEC dos biofilmes mistos



Ao comparar as idades 67 v.s. 115h e as cepas UA159 v.s. $\Delta gtfB$ não se observaram diferenças significante ($p > 0,05$, ANOVA two way seguido de post-test de Sidak's). Os dados reresentados são médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad

Fonte: Adaptado de Castillo²², 2016.

No presente modelo de biofilme misto a população de *S. mutans* era escassa em 29h (Figura 37) ²², e estava competindo em um ambiente escasso de recursos. O eDNA ajuda na contrução e estabilidade da MEC e parecem ter uma interação com os EPS ^{65, 77, 79, 90, 126, 171}, provavelmente o fato de deletar o gene *gtfB* mudou o comportamento drasticamente. No caso do biofilme UA159 as células de *S. mutans* (que já estavam aderidas na superfície de hidroxiapatita) se encontravam competindo ativamente para prosperar no biofilme, provavelmente com finalidades de se preservar como espécie e favorecer a comunidade, algumas células ditas

altruístas realizaram autólise ⁴, trazendo como resultado a disponibilização de eDNA que serve como fonte de nutriente e também como componente na MEC, ajudando *S. mutans* a conquistar seu espaço no biofilme em desenvolvimento ^{12, 28, 171}, e no final formando um biofilme mais complexo para UA159 como observado na microscopia confocal (Figura 9).

O sistema de dois componentes *lytST* teve um comportamento divergente entre o sensor de estímulos (*lytS*) e o regulador de resposta (*lytT*) ⁴. O sensor foi influenciado pelas condições ambientais (pH e abundância de recursos), enquanto o regulador foi expresso em magnitudes muito baixas (foi detectado em média 2×10^2 cópias) provavelmente isto levou a ser interpretado como semelhança em todos os horários avaliados. Esta similaridade de expressão gênica entre horários e cepas indica que esse gene possa interferir com múltiplas vias metabólicas simultaneamente, não apenas na autólise, mesmo que seja expresso em baixas quantidades.

Ainda o gene *lytS* teve um comportamento semelhante entre os dois biofilmes, maior expressão nos horários em que o meio de cultura estava fresco (2h após de incubação em meio de abundância). Para o biofilme $\Delta gtfB$ a expressão gênica nos horários em que meio estava “fresco” foi diminuindo conforme envelhecia (55, 79 e 103h) sendo inversamente proporcional com o aumento na expressão do operon *lrgAB* nos mesmo horários (Figura 30). Para o biofilme UA159 parece não ocorrer relação entre o *lytST* e o *lrgAB* já que as dinâmicas não tinham padrões em comum, nem complementares.

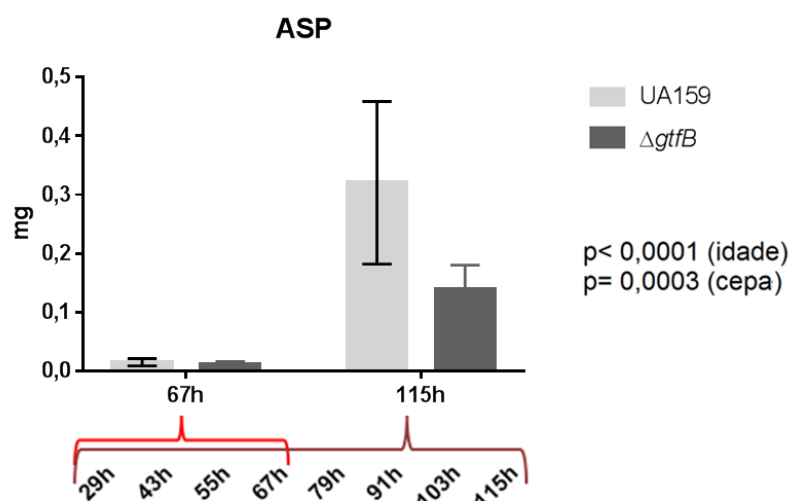
O gene *ccpA* que codifica a proteína de controle catabólico tem natureza reguladora e está envolvido em diferentes processos metabólicos⁴, possivelmente sendo um gene constitutivo que é expresso em todos os horários sem apresentar maiores diferenças. No caso do biofilme UA159 parece estar relacionado com disponibilidade de recursos (maior expressão em 55, 79 e 103h) e tem semelhança com o perfil apresentado por *lytS*. Porém, no biofilme de $\Delta gtfB$ não se distingue nenhum padrão de comportamento para *lytS* que ajude a esclarecer sua função.

A expressão dos genes relacionados com a síntese, união e remodelação dos EPS tiveram um comportamento semelhante entre os dois biofilmes. Todos os genes apresentaram um pico de expressão em 55h (comportamento semelhante se observou em 79h e 103h), confirmando que a expressão de genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* é induzida pela disponibilidade de substrato e em pH ácido ^{16, 41} e para a construção da

MEC. Os níveis de expressão deste grupo de genes foram menores no biofilme $\Delta gtfB$ comparado com UA159, sendo detectadas diferenças em 43, 55, 79 e 103h (Figura 36).

O gene *gtfB* codifica a enzima encarregada da síntese de glucanos insolúveis em água ou solúveis em álcali (ASP do inglês *alkali soluble polysaccharides*). Este gene só foi avaliado na cepa parental, porém em estudo anterior se quantificou ASP nos dois tipos de biofilme tendo como resultado menores valores para o biofilme $\Delta gtfB$ tanto em 67 quanto em 115h²² (Figura 40). O gene *gtfD* codifica a enzima encarregada da síntese de glucanos solúveis, os níveis de expressão deste gene foram afetados quando o gene *gtfB* foi deletado tendo 5,7 vezes menos número de cópias (em média), o que coincide com achados do estudo anterior, com quantidades menores de polissacarídeos solúveis em água (WSP do inglês *water soluble polysaccharides*) nos biofilmes crescidos com a cepa $\Delta gtfB$ tanto em 67 quanto em 115h²² (Figura 41). O gene *gtfC* por sua parte codifica a enzima encarregada de sintetizar glucanos solúveis e insolúveis, e a deleção do gene *gtfB*, afetou drasticamente a magnitude de sua expressão, diminuindo em média mais de 100 vezes (Figura 36) e deve refletir na quantificação de ASP e WSP.

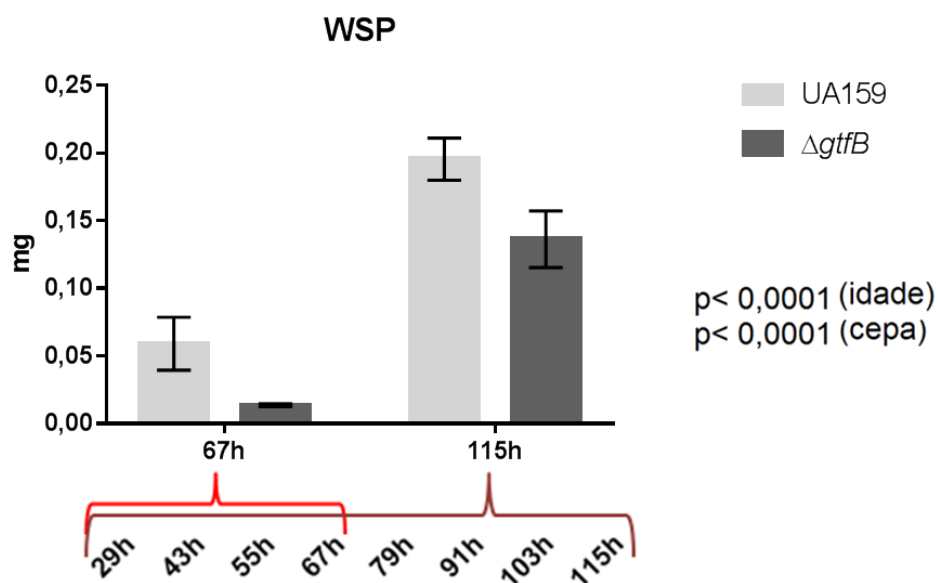
Figura 40 – ASP na MEC dos biofilmes mistos



Detectaram-se diferenças ao comparar as idades 67 v.s. 115h para as duas cepas ($p < 0,0001$), alias no horário de 115h existiu diferença entre os biofilmes UA159 e $\Delta gtfB$ ($P = 0,0003$). Os dados representados são médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Realizado teste ANOVA two way seguido de post-test de Sidak's. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad

Fonte: Adaptado de Castillo²², 2016.

Figura 41 – WSP na MEC dos biofilmes mistos



Existiram diferenças estatísticas ao comparar as idades 67 v.s. 115h e os biofilmes UA159 v.s. $\Delta gtfB$ ($P < 0,0001$, ANOVA two way seguido de post-test de Sidak's). Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad

Fonte: Adaptado de Castillo²², 2016.

No biofilme $\Delta gtfB$ foi detectada uma diferença de mais de 3,3 vezes (em media) na expressão do gene *dexA* (o qual codifica a enzima dextranase A encarregada de remodelar a estrutura de EPS). O gene *gbpB* (que codifica a GbpB encarregada de ligar glucanos solúveis e insolúveis) apresentou uma diminuição na expressão de 9,4 vezes (em media) para $\Delta gtfB$ que para UA159 (Figura 36). A diferença entre as quantidades de polissacarídeos solúveis e insolúveis que existem entre os dois biofilmes concordou com a diferença na expressão deste grupo de genes e ainda com as imagens de microscopia confocal comprovando que os biofilmes formados pela cepa $\Delta gtfB$ tem uma topografia mais simples e uma limitação na configuração 3D da MEC^{22, 82, 176} (Figura 9).

Quanto mais maduro se torna o biofilme, a MEC se torna mais estável e dificulta a difusão no biofilme, tanto para a entrada de nutrientes, como para a saída de metabólitos^{18, 39}. Consequentemente, as células de *S. mutans* que se encontram embebidas nas regiões mais internas do biofilme já não conseguiam sintetizar glucanos, pelo contrário começaram a expressar genes que ajudassem com a tolerância ácida¹⁵⁷. Assim, gerando um comportamento paradoxo entre o aumento

nas quantidades de EPS (de 67 para 115h) e a diminuição progressiva da expressão destes genes (Figuras 26 e 32) em períodos que se tinha mais disponibilidade e o meio de cultura estava “fresco”. Isto pode ser explicado porque só os microrganismos que estavam nas regiões mais externas precisavam continuar criando MEC, no entanto os EPS solúveis e insolúveis eram quantificados no total do biofilme ²², sendo o resultado do somatório dos depósitos acumulados longitudinalmente.

7 CONCLUSÃO

Todos os genes de *S. mutans* avaliados no estudo foram expressos durante as diferentes idades do biofilme, tendo diversos níveis e diferentes comportamentos:

- Os genes relacionados com o metabolismo do LTA foram fortemente influenciados pela disponibilidade de recursos, apresentando um comportamento e valores semelhantes entre os biofilmes crescidos pelas duas cepas UA159 e $\Delta gtfB$ (exceto o gene *dltB*).
- Os genes associados a eDNA apresentam a maior variabilidade entre as duas cepas. O operon *IrgAB* apresentou um pico de expressão as 29h para biofilme UA159. No caso dos biofilmes crescido com $\Delta gtfB$ se observou uma relação inversa entre o gene *lytS* e *IrgAB*.
- A expressão dos genes associados à EPS estava diretamente relacionada com uma maior disponibilidade de carboidratos. O comportamento das duas cepas foi bem semelhante, porém, a magnitude de expressão foi menor para $\Delta gtfB$.

O gene *gtfB* demonstrou sua importância na construção do biofilme, pois foi afetada a expressão (e consequente acúmulo) de alguns constituintes principais da MEC (i.e., EPS e LTA).

REFERÊNCIAS*

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (11): 5721-32.
2. Abranches J, Nascimento MM, Zeng L, Browngardt CM, Wen ZT, Rivera MF, et al. CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008;190(7):2340-9.
3. Ahn SJ, Qu MD, Roberts E, Burne RA, Rice KC. Identification of the *Streptococcus mutans* LytST two-component regulon reveals its contribution to oxidative stress tolerance. *BMC Microbiol.* 2012; 1 (12): 187.
4. 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.
5. Ahn SJ, Rice KC. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg system through CidB function. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82 (20): 6189-203.
6. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (22):14434-9.
7. 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.
8. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent.* 2009; 21 (1): 3-8.
9. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14 (2):89-99.
10. Banas JA, Russell RR, Ferretti JJ. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun.* 1990; 58(3): 667-73.
11. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004; 9:1267-77.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

12. Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(9):721-6.
13. 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.
14. Bergeron LJ, Morou-Bermudez E, Burne RA. Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *J Bacteriol.* 2000; 182 (13):3649-54.
15. Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J, Kuzmiak-Jones H, Cole MF. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. *J Am Dent Assoc.* 1980; 100 (5): 677–81.
16. 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.
17. Bowen, William H. The Stephan Curve revisited. *Odontology* 2013; 101 (1): 2-8.
18. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005; 13 (1):20-6.
19. 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.
20. Bustin, SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55 (4): 611-22.
21. Carlsson, J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *J Adv Dent Res.* 1997; 11 (1): 75-80.
22. Castillo MCP. Função de DNA extracelular e de ácido lipoteicoico nas propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular de biofilmes cariogênicos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2016.
23. 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.

24. Ciardi JE, Reilly JA, Haller RH, Bowen WH, Rølla G. The role of lipoteichoic acid in the adherence and colonization of oral streptococci. In: Shockman GD, Wicken AJ, editor. Chemistry and biological activities of bacterial surface amphiphiles. New York: Academic Press; 1981. p. 353-64.
25. Cross SE, Kreth J, Zhu L, Sullivan R, Shi W, Qi F, Gimzewski JK. Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. Microbiology. 2007; 153 (Pt 9): 3124–32.
26. Cury JA de Oliveira BH, AP dos Santos, Tenuta LM. Are dental fluoride releasing materials clinically effective on caries control? Dent Mater. 2016; 32 (3): 323-33
27. Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. Anal Biochem. 2007; 365 (2):208-14.
28. Das T, PK Sharma, 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.
29. 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 (3):344-58.
30. 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.
31. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK, et al. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 2011; 79 (2): 786-96.
32. Dye BA, Tan S, Smith V, Lewis BG, Barker LK, Thornton-Evans G, et al. Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. Vital Health Stat 11. 2007; (248):1-92.
33. Ellwood DC, Tempest DW. Effects of environment on bacterial wall content and composition. Adv Microb Physiol. 1972; 7: 83–116.
34. Fejerskov O, Manji F. Reactor paper: risk assessment in dental caries. In: Bader JD, editor. Risk assessment in dentistry. North Carolina, Chapel Hill: University of Dental Ecology; 1990. p. 215–7.

35. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; 38 (3): 182 – 91.
36. Firestone AR, Schmid 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.
37. Fitzgerald RJ, Adams BO, Fitzgerald DB, Knox KW. Cariogenicity of human plaque lactobacilli in gnotobiotic rats. *J Dent Res.* 1981; 60(5):919-26.
38. Fitzgerald RJ, Fitzgerald DB, Adams BO, Duany LF. Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters. *J Dent Res.* 1980;59(5):832-7.
39. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9):623-33.
40. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-75.
41. Fu DT, Robyt JF. Maltodextrin acceptor reactions of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydr Res.* 1991; 217: 201-11.
42. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002; 43(6): 1367–78.
43. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(18):6357-67.
44. Grönroos L, Saarela M, Mättö J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infect Immun.* 1998; 66(6): 2595-600.
45. Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immunol.* 2001; 69(5): 3423-6.
46. Gründling A, Schneewind O. Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (20): 8478-83.
47. Guo L, Hu W, He X, Lux R, McLean J, Shi W. Investigating acid production by *Streptococcus mutans* with a surface-displayed pH-sensitive green fluorescent protein. *PLoS One* 2013; 8 (2):e57182.

48. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2013; 41(2):107-9, 112-8.
49. Haas W, Banas JA. The glucan binding domain of the *Streptococcus mutans* glucan binding protein. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 418: 707-8.
50. Haisman RJ, Jenkinson HF. Mutants of *Streptococcus gordonii* Challis over-producing glucosyltransferase. *J Gen Microbiol.* 1991; 137 (3):483-9.
51. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44 (2):331-84.
52. 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.
53. 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.
54. Hayacibara MF, Koo H, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Scott-Anne K, Cury JA, et al. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. *Carbohydr Res.* 2004; 339 (12): 2127-37.
55. Hayes M, Da Mata C, Cole M, McKenna G, Burke F, Allen PF. Risk indicators associated with root caries in independently living older adults. *J Dent.* 2016; 51: 8-14.
56. Hazlett KR, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Inactivation of the gene of *Streptococcus mutans* gbpA alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the genes gtfB and gtfC. *Infect Immun.* 1999; 67 (8): 3909-14.
57. Hazlett, KR, Michalek SM, Banas JA. Inactivation of the gbpA gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes in vivo accumulation of recombinations between the glucosyltransferase B and C genes. *Infect Immun* 1998; 66 (5): 2180-5.
58. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: role of saliva and dental plaque in dynamic process of demineralization and remineralization (Part 1). *J Clin Pediatr Dent* 2003; 28 (1): 47 – 52.

59. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: enamel structure and caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (Part 2). *J Clin Pediatr Dent*. 2004; 28 (2): 119 - 24.
60. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization and remineralization (Part 2). *J Clin Pediatr Dent*. 2004; 28: (3) 203 - 14.
61. Hogg SD, Lightfoot I. Interaction of streptococcal lipoteichoic acid with artificial tooth pellicle. *Arch Oral Biol*. 1989; 34 (8): 615–20.
62. Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47 (1):62-6.
63. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda DNAs. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 2009; 88 (11):. 982-90.
64. 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.
65. Hu W, Li L, Sharma S, Wang J, McHardy I, Lux R, et al. DNA builds and strengthens the extracellular matrix in *Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e51905.
66. Hwang G, Klein MI, Koo H. Analysis of the mechanical stability and surface detachment of mature biofilms by *Streptococcus mutans* applying a range of external shear forces. *Biofouling*. 2014; 30 (9): 1079-91.
67. Hwang G, Liu Y, Kim D, Sun V, Aviles-Reyes A, Kajfasz JK, et al. Simultaneous spatiotemporal mapping of in situ pH and bacterial activity within an intact 3D microcolony structure. *Sci Rep*. 2016; 6: 32841.
68. Igarashi K, Lee IK, Schachtele CF. Effect of dental plaque age and bacterial composition on the pH of artificial fissures in human volunteers. *Caries Res*. 1990;24(1):52-8.
69. 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.

70. Jakubovics NS, Gill SR, SE Iobst, 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.
71. Jordan HV, Keyes PH. Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *Arch Oral Biol.* 1964; 9(4):401-14.
72. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73 (2):310-47.
73. 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.
74. Keyes, PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol.* 1960; 1(4): 304-20,.
75. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004; 83(Suppl 1): C35 - 8.
76. Klapper I, CJ Rupp, Title D, Purevdorj B Stoodley P. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm materials properties. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 80 (3): 289-96.
77. 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.
78. 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* biofilm development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 (3): 837-41.
79. 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.
80. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27 (5):350-61

81. 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.
82. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. J Dent Res. 2013; 92 (12):1065-73
83. 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.
84. Krasse B. The Vipeholm dental caries study: recollections and reflections 50 years later. J Dent Res. 2001; 80 (9):1785-8.
85. 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.
86. Kuramitsu HK, Wondrack L McGuinness M. Interaction of Streptococcus mutans glucosyltransferase with teichoic acids. Infect Immun. 1980; 29 (2): 376-82.
87. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by Streptococcus mutans. Microbiology. 2008; 154 (11):3247-55.
88. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. Int J Dent. 2011; 2001: 953412..
89. Li Y, Burne RA. Regulation of the gtfBC and ftf gene of Streptococcus mutans in biofilms in response to pH and carbohydrate. Microbiology. 2001; 147 (10): 2841-8.
90. 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.
91. Liljemark WF, Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. Crit Rev Oral Biol Med. 1996; 7 (2): 180-98.
92. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev. 1986; 50 (4): 353–80.

93. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 268 (2):158-65.
94. Manji F, Fejerskov O. Dental caries in developing countries in relationship to the appropriate use of fluorides. *J Dent Res* 1990; 69 (2 Suppl): 733-41,
95. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36 (4):893-916.
96. 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.
97. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8 (2): 263–71.
98. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149 (Pt 2): 279-94.
99. 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.
100. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res.* 2000; 79 (6):1371-7.
101. Mattos-Graner RO, Zucchi P, Smith DJ, Duncan MJ. Mutant analysis of the gene encoding glucan binding protein B indicates an essential role in *Streptococcus mutans* (abstract 91). *J Dent Res.* 2002; 81(Spec Iss A):A- 40.
102. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun.* 2001; 69 (11): 6931-41.
103. Mattos-Graner RO, Porter KA, Smith DJ, Hosogi Y, Duncan MJ. Functional analysis of glucan binding protein B from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2006; 188 (11): 3813-25
104. Melvaer KL, Helgeland K, Rölla G. A charged component in purified polysaccharide preparations from *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol.* 1974; 19 (7):589-95.

105. 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.
106. Miller CH. Degradation of sucrose by whole cells and plaque of *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun.* 1974; 10 (6): 1280-91.
107. Ministério da Saúde. Brasil. Conheça a política que faz muitos brasileiros voltarem a sorrir. Brasília. 2015. [acesso 2017 mar 10]. Disponível em: http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_brasil_sorridente.php
108. Ministério da Saúde, Brasil. SB BRASIL 2010 Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Brasília: Editora MS; 2012. [acesso 2017 mar 07]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf
109. Morris A, Steele J, White DA. The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. *Br Dent J.* 2001;191(4):186-92.
110. Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol.* 2009; 4(7): 891–902.
111. 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.
112. Newbrun E. Histopathology of dental caries. In: Newbrun E, Cariology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1979.
113. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73 (3): 407-50.
114. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1 (3): 1559-82.
115. Nyström T. Global systems approach to the physiology of the starved cell. In: Kjelleberg S, editor. Starvation in bacteria. New York: Springer; 1993. p. 129-50.
116. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res.* 1987; 95 (5): 369-80.

117. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 1990; 24 (4):267-72.
118. 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.
119. Ouanounou A. Xerostomia in the geriatric patient: causes, oral manifestations, and treatment. *Compend Contin Educ Dent.* 2016; 37 (5):306-11.
120. Paes-Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006; 85 (10): 878-87.
121. Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol.* 2003; 185 (11): 3400–9.
122. Palmer RJ. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontology 2000.* 2014; 64 (1): 29 - 39
123. 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.
124. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001; 183 (12):3770-83
125. 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):261-66.
126. Petersen FC, Tao L, Scheie AA. DNA Binding-Uptake System: a Link between Cell-to-Cell Communication and Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 2005; 187 (13): 4392–400.
127. Petersen PE. World Health Organization Global policy for improvement of oral health - World Health Assembly 2007. *Int Dent J.* 2008; 58 (3): 115-21.

128. Pucca GA Jr, Gabriel M, de Araujo ME, de Almeida FC. Ten years of national oral health policy in Brazil: innovation, boldness, and numerous challenges. *J Dent Res*. 2015; 94(10):1333-7
129. Reese S, Guggenheim B. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in *in vitro* biofilms. *Microsc Res Tech*. 2007; 70 (9):816-22.
130. 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.
131. 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.
132. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, PS Handley. Bacterial coaggregation: an integrated process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 2003; 11 (2): 94-100.
133. Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, et al. Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(11):1006-14.
134. Rogers HJ, Morgan AG, Batley H, Deery C. Why, what and how: caries control for erupting molars. *Dent Update* 2015; 42 (2):154-6, 159.
135. Rogers JD, Palmer RJ Jr, 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.
136. Rölla 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 (1):186-90.
137. Rölla G, Oppermann RV, Bowen WH, Ciardi JE, Knox KW. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque *in vivo*. *Caries Res*. 1980; 14 (4):235-8.
138. Sagan C. Voce está aqui. In: Sagan C. Pálido ponto azul uma visão da humanidade no espaço. São Paulo: Companhia das letras; 1996.
139. Sahin K, Khashai F, Forghany A, Krasieva T, Wilder-Smith P. Exploring mechanisms of biofilm removal. *Dentistry (Sunnyvale)*. 2016; 6 (4): 371.

140. Sampaio-Maia B, Monteiro-Silva F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: an update. *Dent Res J*. 2014; 11(3): 291–301.
141. Sanders WE, Sanders CC. Modification of normal flora by antibiotics: effects on individuals and the environment. In: Koot RK, Sande MA, editor. *New dimensions in antimicrobial chemotherapy*. New York: Churchill Livingstone; 1984. p. 217–41.
142. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4 (3-4): 301-7.
143. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res*. 1995; 74 (7): 1360-6.
144. Schilling KM, Bowen WH. The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva- coated hydroxyapatite. *J Dent Res*. 1988; 67 (1):2-8.
145. Schooling SR, Hubley A, TJ Beveridge. Interactions of DNA With biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol*. 2009; 191 (13): 4097-102.
146. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369 (9555):51-9.
147. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, FG Oppenheim. Identification of protein components in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS / MS. *J Proteome Res* 2007; 6 (6): 2152-60.
148. Smith EG, Spatafora GA. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J Dent Res*. 2012;91 (2):133-41.
149. Soares CL. Constructing public oral health policies in Brazil: issues for reflection. *Braz Oral Res*. 2012; 26 (Suppl 1): 94-102.
150. 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.
151. Spatafora G, Rohrer K, Barnard D, Michalek S. A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo. *Infect Immun*. 1995; 63 (7):2556-63.

152. 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.
153. Srinivasan D, Louis CJ. Evaluation of caries in deciduous second molar and adjacent permanent molar in mixed dentition. *J Pharm Biomed Sci.* 2015; 7 (2):S572-5.
154. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71 (9):5404-10.
155. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6 (3):199-210.
156. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gbpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23 (6): 466-73.
157. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90 (3): 294-303
158. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from "who are they?" to "what are they doing?". *J Dent Res.* 2015; 94 (12):1628-37
159. Tanzer JM, Thompson, Sharma K, Vickerman MM, Haase EM Scannapieco FA. *Streptococcus mutans* out-compete *Streptococcus gordonii* in vivo. *J Dent Res* 2012; 91 (5): 513-9.
160. Ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res.* 2012; 91 (9): 813-5.
161. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; 486 (7402): 207-14.
162. Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, Guggenheim B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (3): 1702-9.
163. Vacca-Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res.* 2007; 41 (6): 445-50.

164. 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.
165. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG Jr, 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.
166. Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (10): 4152-7.
167. van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J. Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 214-28
168. 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.
169. Venkitaraman AR, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Bowen WH. Characterization of glucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; 74 (10):1695-701.
170. Walker GJ, Pulkownik A, Morrey-Jones JG. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol.* 1981; 127 (1): 201-8.
171. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002; 295 (5559):1487.
172. World Health Organization. WHO releases new report on global problem of oral diseases. [acesso 2017 fev 24]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/en/>
173. World Health Organization. The world oral health report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century. The approach of the WHO Global Oral Health Programme. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2003. [acesso 2017 fev 21]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68506/1/WHO_NMH_NPH_ORH_03.2.pdf

174. Wozniak DJ, Parsek MR. Surface-associated microbes continue to surprise us in their sophisticated strategies for assembling biofilm communities. *F1000Prime Rep.* 2014; 6:26.
175. 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
176. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, 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.
177. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Zitsu 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.
178. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(3): 213-21.
179. Zhang X, Senpuku H. Dynamic Changes in the initial colonization of *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii* using a new Animal model. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(1): 11-6.

ANEXO A

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

Bairro: CENTRO

UF: SP

Telefone: 1633-0164

Município: ARARAQUARA

Fax: 1633-0164

CEP: 14.801-903

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)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho apartir de 18 de Maio de 2019

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 18 de Maio de 2017.

ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA