

Estudo das interações de estreptococos orais com célula de carcinoma de células escamosas de língua mediadas pela endopeptidase bacteriana PepO: resultados preliminares.

Autores: Emmanuely de O. C. dos Santos (Faculdade de odontologia de Piracicaba/ Unicamp); Eduardo M. Franco (Faculdade de odontologia de Piracicaba/ Unicamp); Iara G. de Aquino (Faculdade de odontologia de Piracicaba/ Unicamp); Débora C. Bastos (Faculdade de odontologia de Piracicaba/ Unicamp); Profª Drª Renata O. Mattos-Graner (Orientadora/ Faculdade de odontologia de Piracicaba/ Unicamp)

Resumo

Diferentes cânceres de humanos albergam microbiomas intracelulares, os quais podem modular a agressividade das células tumorais. O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o tipo mais comum de câncer oral. Espécies de estreptococos são abundantes no microambiente de CCEO e há evidências de que expressam fatores para invadir e alterar a fisiologia das células hospedeiras. Entre estes, a endopeptidase O (PepO) expressa por cepas da espécie oral associada a CCEO, *Streptococcus mutans*, promove o escape ao sistema imunológico e a ligação a glicoproteínas do soro e da matriz extracelular. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel de PepO na capacidade de *S. mutans* invadir CCEO e alterar a viabilidade e proliferação de células de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9). Para isto, analisamos o efeito da inativação do gene *pepO* na invasividade das cepas *S. mutans* UA159 e OMZ175 em células SCC-9 mediada ou não por soro humano em ensaios de proteção antibiótica. Como referência, analisamos a cepa mutante do gene da proteína ligadora de colágeno Cnm (*cnm*), o qual é restrito à OMZ157 e envolvido na invasividade desta cepa em células endoteliais. Observamos que OMZ175 invadiu SCC9 com frequência de 4 a 5 vezes maior do que UA159, e que a presença de soro aumenta a invasividade destas cepas. A deleção de *pepO* promoveu redução na invasividade de UA159 e OMZ175, embora sem atingir significância estatística. A invasão por OMZ175 mutante de *pepO* promoveu discretas alterações na viabilidade de SCC-9 que ainda serão confirmadas com as replicatas experimentais. Estes dados preliminares sugerem que *pepO* pode contribuir para a invasividade de cepas *S. mutans* em células de CCEO e mais importante, pode influenciar na viabilidade destas células.

Palavras-chave: Câncer oral, fator de virulência, invasividade.

Introdução

O câncer oral compreende quase 2% dos casos de câncer no mundo, sendo responsável por 177.384 mortes por ano (Bray et al., 2018; Al-Hebshi et al., 2019). O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) corresponde a mais de 90% dos subtipos de câncer oral (El-Naggar et al., 2017), sendo o sexto câncer mais comum no mundo e cujos fatores de risco incluem o consumo de tabaco, álcool, exposição a poluentes do ambiente e infecções virais como HPV (Johnson, D. E., et al., 2020). O reconhecimento da abundância e diversidade do microbioma nos diferentes nichos bucais, assim como nos microambientes de diferentes tipos de tumores em humanos despertou grande interesse no estudo do papel do microbioma na patogênese e progressão de CCEO. Na cavidade bucal, algumas espécies bacterianas são mais abundantes no microbioma de CCEO do que em mucosa saudável (Elsalem et al., 2020). Entre estas, destacam-se *Porphyromonas gingivalis* em CCEO gengivais e diferentes espécies de estreptococos, incluindo-se *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus sanguinis* (Elsalem et al., 2020). A proteína PepO integra um grupo de metalo-endopeptidases altamente conservado entre espécies de estreptococos da mucosa orofaríngea e bucal (Wilkening et al., 2016; Alves et al., 2020) e que ao se ligar a à

glicoproteína plasmática ligadora de C4b (C4BP, C4b-binding protein) escapa da ativação do sistema complemento (Alves et al., 2020), além disso, há evidências que demonstram que a atividade da peptidase de PepO de estreptococos bucais favorece a infecção de células epiteliais bucais por HPV (Pavlova et al., 2019). Deste modo, o objetivo desse projeto foi investigar a participação de PepO na capacidade de cepas *S. mutans* de invadir células de carcinoma de células escamosas de língua e alterar os fenótipos destas células relacionados à proliferação e à invasividade.

Material e Métodos

Cultura

- Células SCC9 p-33
- Meio DMEM/F-12 + 10% FBS
- Placa de Petri 90 x 20 mm

Plaqueamento

- Meio DMEM/F-12 + 10% FBS

INVASIVIDADE

- 3×10^4 células em cada poço
- Placas de 24 poços

VIABILIDADE

- 5×10^5 células em cada poço – 2 horas
- $8,5 \times 10^5$ células em cada poço – 16 e 24 horas
- Placas de 24 poços

CICLO CELULAR

- 2×10^5 células em cada poço – 24 e 48 horas
- Após o plaqueamento foi realizada a sincronização do ciclo por 24h por careciamento de FBS no meio de cultura
- Placas de 6 poços

Exposição bacteriana

- Após 24 h do plaqueamento e, quando necessário, careciamento por um período adicional de 24h, as células SCC9 foram expostas por 2 horas à aproximadamente 1×10^7 UFC/ml das bactérias por 2 horas.
- Cepas utilizadas:
 - *Streptococcus mutans*: UA159, UA159 *pepO*⁻, UA159 *pepO*⁺ (piloto para invasividade)
 - *Streptococcus mutans*: OMZ175, OMZ175 *pepO*⁻, OMZ175 *pepO*⁺, OMZ175 *cnm*⁻

Análise

INVASIVIDADE

- Exposição à penicilina (50 ug/ml) e gentamicina (300 ug/ml) – 1 hora
- Lise osmótica – 1 mL dH2O por poço – 20 minutos @RT
- Plaqueamento e incubação do lisado obtido em BHI-Agar - 37°C, 10% de CO₂, 48 h: determinação do número de bactérias viáveis (UFC/ml)
- Plaqueamento e incubação do inóculo inicial – idem
- Cálculo da porcentagem de invasão bacteriana: (UFC/mL intracelular X 100)/inóculo inicial

VIABILIDADE

- MTT a 50µg/mL – 3 horas – 37°C
- Eluição dos cristais em EtOH absoluto
- Leitura em Leitor de Elisa 595mM (correção a 655 nM)

CICLO CELULAR

- Fixação em EtOH 70%
- Incubação com iodo de propídeo (Pi)
- Leitura em citômetro de fluxo – FL2
- Análise: software CellQuest (Becton Dickinson)

Resultados e Discussão

Avaliação da invasividade de mutantes da cepa UA159 em células SCC9

No estudo piloto realizado com a cepa UA159, houve uma redução, não estatisticamente significativa, no grau de invasividade da cepa UA159 *pepO*⁻ (gene *pepO* deletado) e UA159 *pepO*⁺ (gene *pepO* reinserido em *pepO*⁻ ou complementado) em relação à cepa parental (WT) nas 3 condições de cultivo: PBS (Figura 1A), soro (Figura 1B) e soro inativado (Figura 1C). Observamos também um aumento na invasividade da cepa UA159 *pepO*⁺ em relação à UA159 *pepO*⁻ na presença de soro (Figura 1B) e soro inativado (Figura 1C). No entanto, a invasividade da cepa UA159 wild type (WT) nas células SCC9 foi de aproximadamente 12% em todas as condições de cultivo bacteriano: presença de PBS (Figura 1A), exposição ao soro humano (Figura 1B) e soro humano inativado (Figura 1C). Estes dados foram obtidos concomitantemente ao estudo da cepa OMZ175

(Figura 2), que apresentou invasividade média de aproximadamente 50%. Sendo assim, a cepa escolhida para as análises funcionais de viabilidade (Figuras 3-5) e ciclo celular (Figura 6) foi a OMZ175.

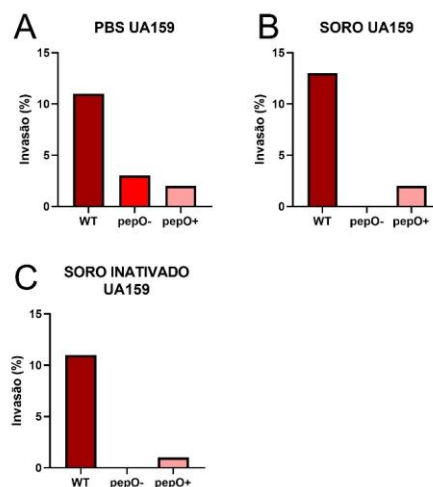


Figura 1: A invasividade da cepa UA159 e de seus mutantes para o gene *pepO* é baixa em células SCC9. O cultivo da cepa UA159 wild type (WT) não é significativamente afetado pela exposição ao soro humano (B) em comparação aos controles PBS (A) e soro humano inativado (C) se mantendo em torno de 10-13% de invasividade. Apenas as cepas que possuem a deleção do gene *pepO* apresentaram uma pequena redução de sua invasividade quando expostas ao soro humano (B) e soro inativado (C) quando comparadas ao cultivo em PBS (A). Gráficos representam os resultados de um experimento piloto.

Avaliação da invasividade de mutantes da cepa OMZ175 em células SCC9

O resultado do estudo de invasividade da cepa bacteriana OMZ175 e de seus mutantes para *pepO* e *cnm* em SCC9 teve seu resultado expresso na Figura 2. O cultivo da cepa OMZ *pepO*⁻ na presença de soro (Figura 2B) e em soro inativado (Figura 2C) mostra uma menor invasividade (não significativa) em comparação com a cepa OMZ selvagem (WT). Conforme esperado, a exposição ao mutante *pepO* complementado (*pepO*⁺) cultivado na presença de soro humano promove leve aumento da invasividade na presença do soro humano (Figura 2B), porém de maneira não significativa. A inclusão de um novo experimento poderá nos fornecer dados suficientes para uma análise estatística final. Não houve diferenças na invasividade das cepas selvagens e mutantes para *pepO* cultivadas em PBS (Figura 2A) não apresentou diferenças na invasividade das ressaltando um leve incremento, não significativo, da invasividade da cepa mutante *pepO*⁻ em relação às demais cepas (WT e *pepO*⁺). É importante ainda ressaltar que a cepa OMZ *cnm*⁻ não apresentou capacidade de invasão nas células SCC9 em nenhuma das condições estudadas.

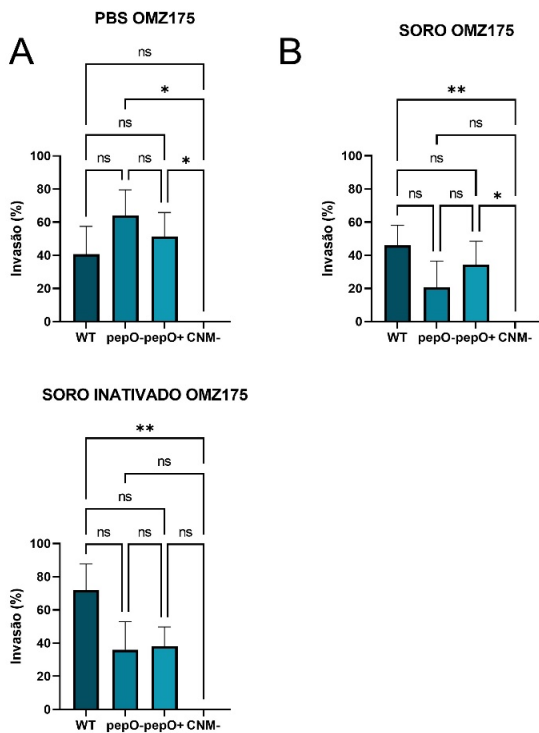


Figura 2. Invasividade de OMZ175, OMZ175 *pepO*⁻ e OMZ175 *pepO*⁺ em células tumorais SCC9. As cepas bacterianas foram cultivadas em PBS (A), soro (B) e soro inativado (C) PBS. O cultivo da cepa OMZ175 *wild type* (WT) não é afetado pela exposição ao soro humano (B) em comparação aos controles PBS (A) e soro humano inativado (C). Nota-se que a cepa *cnm*⁻ não apresenta invasividade nas células SCC9. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. **p*<0.05, ***p*<0.005, one-way ANOVA, post test Tukey.

Resultados de padronizações experimentais para viabilidade e ciclo celular: estudos em andamento.

1) Viabilidade imediata de células SCC9 expostas à cepa OMZ e seus mutantes para *pepO* e *cnm*.

A partir da análise dos gráficos a seguir (Figura 3) é possível concluir que a viabilidade da SCC9 não foi afetada imediatamente após a exposição por 2 horas à cepa OMZ175 e seus mutantes nas 3 condições de cultivo bacteriano: PBS (Figura 3A), soro humano (Figura 3B) e soro inativado (Figura 3C). Note que, em nas três condições de cultivo bacteriano (PBS-3A, soro-3B e soro inativado-3C), todas as cepas apresentaram viabilidade igual à da SCC9 não exposta às bactérias (valor normalizado para 1). Considerando que a invasão das cepas OMZ (Figura 2) é alta no período de exposição de 2 horas (em torno de 50%), este resultado foi importante para a decisão de manter as SCC9 por mais tempo após a exposição inicial para que efeitos posteriores na expressão gênica (decorrentes da exposição bacteriana) pudessem, eventualmente, se tornar evidentes. A partir destes resultados, foi decidido

manter as células por 18 horas de exposição na ausência de antibióticos (Figura 4).

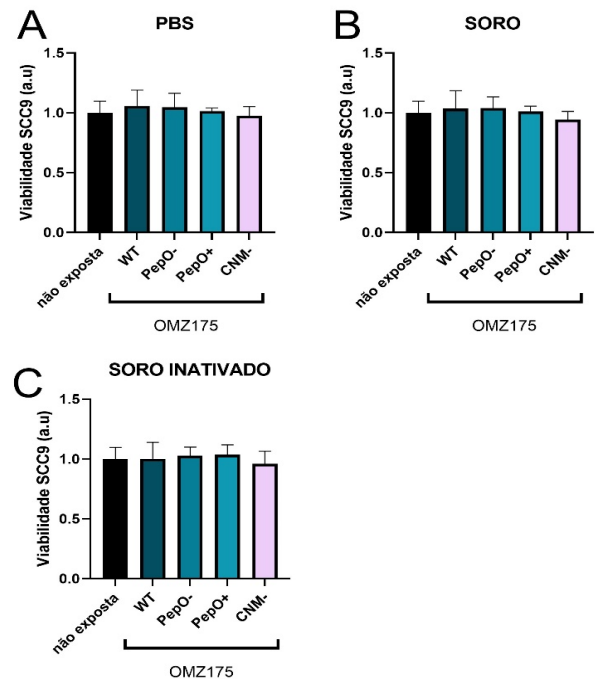


Figura 3. A viabilidade das SCC9 não é afetada pela exposição às cepas selvagens e mutantes de OMZ175 após duas horas de exposição. Nota-se que a viabilidade das SCC9 expostas às OMZ175 selvagens e mutantes cultivadas em PBS (A), soro (B) e soro inativado (C) não sofreu alterações. Gráficos representam os resultados de um experimento piloto.

2) Viabilidade de células SCC9 após 18 horas da exposição à cepa OMZ e seus mutantes para *pepO* e *cnm*.

As células SCC9 foram expostas por 2 horas às cepas bacterianas selvagens e mutantes e após 18 horas foi realizado o ensaio de viabilidade celular. Neste desenho experimental, após a exposição bacteriana, as células foram lavadas e as bactérias que não invadiram foram removidas, porém não houve a incubação com os antibióticos penicilina e gentamicina com o intuito de observarmos eventuais incrementos na interação bactéria/célula tumoral. A partir dos gráficos observados na Figura 4, observamos que as bactérias remanescentes no meio de cultura não expostas ao antibiótico foram capazes de metabolizar o sal de MTT e, portanto, não apresentou diferenças entre as cepas WT e mutantes nas 3 condições de cultivo bacteriano: PBS (Figura 4A), soro (Figura 4B) e soro inativado (Figura 4C). Apesar disso, esta informação foi relevante para notarmos que as células SCC9 foram expostas a uma quantidade muito menor de bactérias do grupo *pepO*⁻, cultivadas em soro humano (Figura 4B – seta

vermelha). Assim, para os demais experimentos (Figura 5 e 6) foram feitas checagens da quantidade de bactérias no inóculo inicial por espectrometria a fim de evitar erros técnicos que tendenciem a interpretação dos resultados e utilizamos, então, os antibióticos após a incubação.

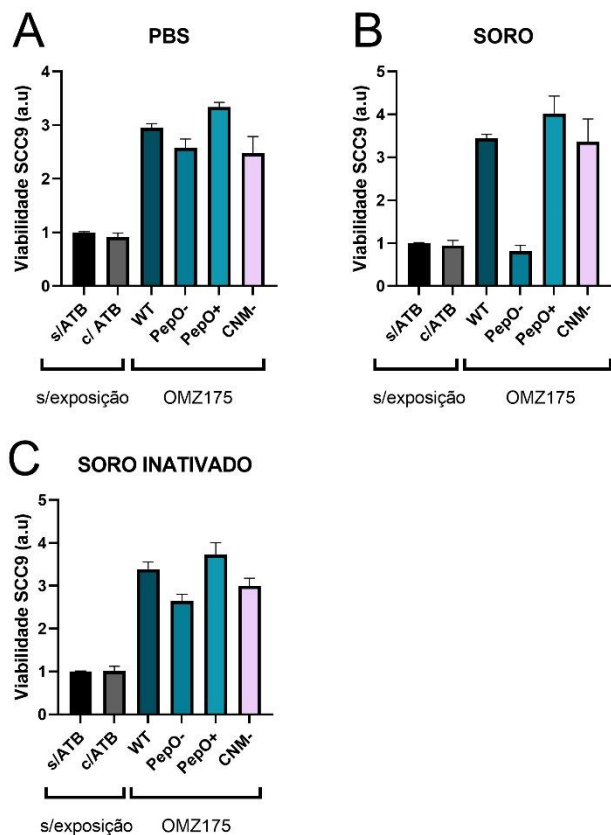


Figura 4. Viabilidade de SCC-9 após 18 horas da exposição a cepas *S. mutans* por período de 2 h. Tanto em PBS quanto em soro e soro inativado, a viabilidade celular da SCC9 sem exposição à *S. mutans* (com antibiótico e sem) manteve-se próximo a 1. As bactérias não expostas ao antibiótico que restaram no meio de cultura foram capazes de metabolizar o sal de MTT promovendo um aumento relativo da viabilidade em relação às SCC não expostas às cepas bacterianas em todas as condições de cultivo: PBS (A), soro (B) e soro inativado (C). Gráficos representam os resultados de um experimento piloto.

3) Viabilidade de células SCC9 após 24 horas da exposição à cepa OMZ e seus mutantes para *pepO* e *cnm*. Nesta etapa, as células SCC9 foram expostas por 2 horas às cepas bacterianas selvagens e mutantes e após 24 horas foi realizado o ensaio de viabilidade celular. Neste desenho experimental, após a exposição bacteriana, as células foram lavadas incubadas por 1 hora com os antibióticos penicilina e gentamicina. Inicialmente, conforme esperado, observamos que as células SCC9 (não expostas às bactérias) tiveram uma leve perda a sua viabilidade quando incubadas com o

antibiótico penicilina e gentamicina (Figura 5A-C). Os dados da viabilidade ainda são inconclusivos pois apenas um experimento foi realizado. No entanto, observamos sutis diferenças na viabilidade das SCC9 expostas aos mutantes de *pepO* e *cnm* em relação ao WT nas 3 condições de cultivo bacteriano. É interessante notar que a exposição da SCC9 à cepa *cnm* (que não apresenta invasão nas células SCC9) também é levemente modulada nas 3 condições de cultivo. A repetição deste desenho experimental poderá proporcionar maiores informações sobre a modulação da viabilidade das células tumorais após invasão bacteriana. De fato, a reprodutibilidade experimental já está sendo realizada.

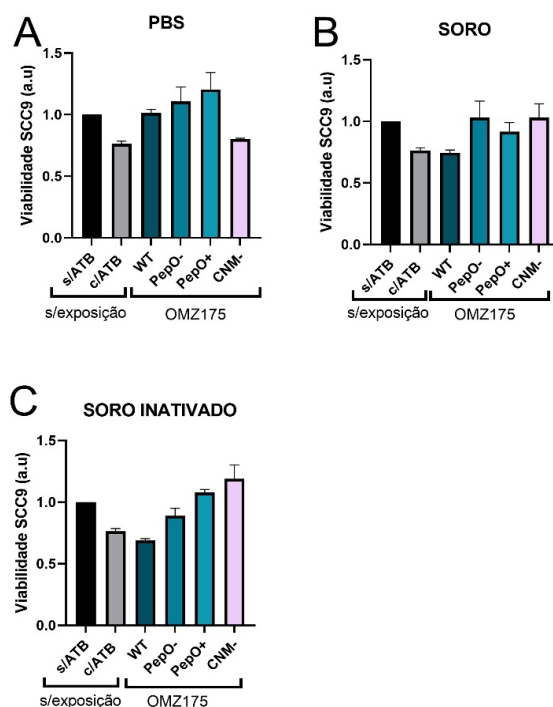


Figura 5. Viabilidade celular pós 24 horas SCC9 após duas horas de exposição. A análise após 24 horas da exposição nos mostra leves modulações na viabilidade das SCC9 expostas à cepas selvagens e mutantes de OMZ175 cultivadas em PBS (A), soro (B) e soro inativado (C).

4) Análise de estudo piloto do ciclo celular das SCC9 após 24 e 48 horas da exposição à cepa OMZ e seus mutantes para *pepO* e *cnm*.

Neste experimento observamos que o ciclo celular não foi afetado pela exposição às cepas bacterianas selvagens e mutantes para *pepO* nos períodos estabelecidos de 24 (Figura 6A) e 48 horas (Figura 6B). No entanto, observa-se que as células em 48 horas apresentam parada do ciclo celular evidenciada pela redução da fase S, denotando que as células já estavam em confluência, o que foi também observado na

microscopia. As demais repetições experimentais serão realizadas com menor número de células para evitarmos sobreposição dos efeitos da confluência e consequente parada em fase S.

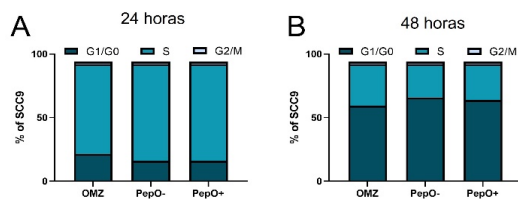


Figura 6. Ciclo celular SCC9 – 2 horas exposição e 24 e 48 horas pós exposição.

Conclusão

O estudo das interações entre a microbiota oral e as células tumorais é desafiador. Neste trabalho observamos que a invasão da cepa agressiva de *S. mutans* OMZ175 em células SCC9 foi de 4 a 5 vezes maior que a cepa UA159. Além disso, observamos que a deleção do gene *pepO* pode interferir na invasão desta cepa. Além disso, observamos que o mutante *cnm* não é capaz de invadir as células SCC9. Ainda, é importante notar que a literatura não é clara nas condições experimentais ideais para a avaliação funcional da interação bacteriana, assim, neste projeto, estamos estabelecendo criteriosamente as condições de cultivo e períodos ideais para a avaliação da viabilidade e do ciclo celular das células tumorais após a invasão bacteriana.

Referências Bibliográficas

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36

cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.

El-Naggar, A.K. What Is New in the World Health Organization 2017 Histopathology Classification?. *Curr. Treat. Options in Oncol.* 18, 43 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0469-x>

Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Nov 26;6(1):92. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3. PMID: 33243986; PMCID: PMC7944998.

Elsalem L, Jum'ah AA, Alfaqih MA, Aloudat O. The Bacterial Microbiota of Gastrointestinal Cancers: Role in Cancer Pathogenesis and Therapeutic Perspectives. *Clin Exp Gastroenterol.* 2020;13:151-185.

Wilkening RV, Chang JC, Federle MJ. PepO, a CovRS-controlled endopeptidase, disrupts *Streptococcus pyogenes* quorum sensing. *Mol Microbiol.* 2016 Jan;99(1):71-87. doi: 10.1111/mmi.13216. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26418177; PMCID: PMC4987125.

Alves, L. A.; Harth-Chu, E. ; Abranches, J. ; Mattos-Graner, Renata O. PepO is a protein involved in *Streptococcus sanguinis* evasion to complement immunity.. In: International Association of Dental Research, 2019, Vancouver. *J Dent Res*, 2019. (Abstract).

Pavlova SI, Wilkening RV, Federle MJ, Lu Y, Schwartz J, Tao L. *Streptococcus endopeptidases* promote HPV infection in vitro. *Microbiologyopen.* 2019;8(1):e00628. doi:10.1002/mbo3.628

Pedicone C, Meyer ST, Chisholm JD, Kerr WG. Targeting SHIP1 and SHIP2 in Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(4):890. Published 2021 Feb 20. doi:10.3390/cancers13040890