



## Investigação do papel dos sistemas reguladores VicRK e CovR na resistência de *Streptococcus sanguinis* a antibióticos

**Palavras-Chave:** Resistência a antibióticos, *Streptococcus sanguinis*, reguladores gênicos

Lúcia A. Y. Tengan<sup>1</sup>, Eduardo M. Franco<sup>1</sup>, Hassan Naveed<sup>1</sup>, Tsute Chen<sup>2</sup>, Renata de O. Mattos-Graner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (FOP-UNICAMP), <sup>2</sup>The Forsyth Institute, Cambridge, MA, E.U.A.

### INTRODUÇÃO

*Streptococcus sanguinis* é uma das espécies comensais benéficas mais abundantes no microbioma bucal, que tem como característica a alta competitividade para colonizar as superfícies do esmalte na ausência de sacarose (Kreth et al., 2017). No entanto, apesar de sua característica comensal na cavidade bucal, *S. sanguinis* está comumente associada a infecções cardiovasculares oportunistas, como a endocardite infecciosa (EI).

Os sistemas de dois componentes (SDC) modulam os transcriptomas bacterianos em resposta a estímulos ambientais específicos. Os genomas de cepas de *S. sanguinis* incluem um grande número de SDC completos (12 a 14 SDC) (Mattos-Graner & Duncan, 2017). Resumidamente, estes são formados por duas proteínas básicas, uma sensora de membrana e uma intra-citoplasmática reguladora de resposta. Além destes, *S. sanguinis* apresenta o gene de uma proteína reguladora de resposta órfã (*covR*), a qual recebe essa designação pelo fato de não haver o gene da proteína sensora cognata. Os SDC designados VicRK e CovR regulam genes requeridos para biogênese e manutenção da integridade da parede celular associadas à virulência.

Há evidências de que as infecções sistêmicas associadas a *S. sanguinis* envolvem um subgrupo restrito de cepas com expressão

aumentada de genes de virulência, em decorrência de mutações espontâneas nos genes que codificam as proteínas dos SDCs VicRK e CovR. Portanto, o objetivo deste projeto foi investigar a associação de polimorfismos de VicRK e CovR com os fenótipos de resistência de *S. sanguinis* a antibióticos utilizados para tratamento e prevenção da EI.

### METODOLOGIA

1. Cepas
  - a) Cepas utilizadas descritas na tabela
  - b) Cultivo em BHI (CO<sub>2</sub> 10%, 37°) por 24h.
  - c) Após crescimento, cepas transferidas para tubos contendo 4ml de BHI e incubadas (CO<sub>2</sub> 10%, 37°) por 18h.

Tabela 1. Cepas usadas nesse estudo

Cepas	Sítio de Isolamento	Referência
SK36	Biofilme dental	ATCC
SK49	Biofilme dental	Kilian et al, 1989
SK72	Biofilme dental	Kilian et al, 1989
SK115	Biofilme dental	Kilian et al, 1989
SK160	Biofilme dental	Kilian et al, 1989
SK330	Cavidade oral	Kilian et al, 1989
SK353	Cavidade oral	Kilian et al, 1989
SK678	Corrente sanguínea	Kilian et al, 1989
SK1056	Corrente sanguínea	Kilian et al, 1989

2. Ensaio de determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM, respectivamente) para os antibióticos.

- a) Antibióticos e concentrações testadas apresentadas na tabela 2.
- b) Microplacas de 96 poços contendo 100µl de BHI, 100µl de solução de antibiótico em diluição seriada (1:2)
- c) Adição de 100µl das culturas bacterianas ( $A_{550nm} = 0,05$ ).
- d) Placas incubadas (CO<sub>2</sub> 10%, 37°) por 24h.
- e) Análise visual para detecção de crescimento, determinação das CIM e leituras das absorbâncias em leitor de microplacas (Versa Max).
- f) Para determinação de CBM, alíquotas das amostras em que não se observou crescimento visível foram plaqueadas em meio livre de antibiótico e incubadas por 48h (CO<sub>2</sub> 10%, 37°).

Tabela 2. Antibióticos e concentrações testadas

Antibiótico (faixa de concentração testada)	Classe
Penicilina (0,015 – 9,37 µg/ml)	Beta-lactâmico
Meticilina (0,03 – 18,74 µg/ml)	Beta-lactâmico
Amoxicilina (0,015 – 9,37 µg/ml)	Beta-lactâmico
Eritromicina (0,015 – 9,37 µg/ml)	Macrolídeo
Doxiciclina (0,015 – 9,37 µg/ml)	Tetraciclina
Daptomicina (0,14 – 75,1 µg/ml)	Lipopeptídeo
Dalbavancina (0,015 – 9,37 µg/ml)	Glicopeptídeo
Vancomicina (0,015 – 9,37 µg/ml)	Glicopeptídeo

### 3. Análise polimorfismos de VicRK e CovR

- a) Recuperação sequência dos genomas utilizando GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/>. Etapa realizada em cooperação com Dr. Tsute Chen, The Forsyth Institute, Cambridge, MA, E.U.A.
- b) Alinhamento das sequências proteicas utilizando a ferramenta
- c) *CLUSTALW* <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> para comparação com cepa

Tabela 3. Valores de CIM para *S. sanguinis*

Cepas	Antibióticos; CIM (µg/ml): média ± DP							
	Penicilina	Amoxicilina	Eritromicina	Doxiciclina	Daptomicina	Dalbavancina	Vancomicina	Meticilina
SK36	0,14 ± 0,00	0,48 ± 0,17	2,34 ± 0,00	0,19 ± 0,09	18,75 ± 0,00	0,58 ± 0,00	2,34 ± 0,00	0,58 ± 0,00
SK49	0,14 ± 0,00	0,58 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,14 ± 0,00	37,6 ± 0,00	0,29 ± 0,00	1,17 ± 0,00	0,58 ± 0,00
SK72	0,29 ± 0,00	0,58 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,58 ± 0,00	18,75 ± 0,00	0,14 ± 0,00	1,17 ± 0,00	0,29 ± 0,00
SK115	0,12 ± 0,04	0,14 ± 0,00	0,07 ± 0,00	4,68 ± 0,00	18,75 ± 0,00	0,29 ± 0,00	2,34 ± 0,00	0,07 ± 0,00
SK160	0,14 ± 0,00	0,39 ± 0,17	0,07 ± 0,00	0,29 ± 0,00	18,75 ± 0,00	0,14 ± 0,00	1,17 ± 0,00	0,58 ± 0,00
SK330	0,14 ± 0,00	0,48 ± 0,17	2,34 ± 0,00	1,17 ± 0,00	37,6 ± 0,00	0,07 ± 0,00	1,17 ± 0,00	0,58 ± 0,00
SK353	0,24 ± 0,09	0,58 ± 0,00	0,07 ± 0,00	2,34 ± 0,00	18,75 ± 0,00	0,58 ± 0,00	2,34 ± 0,00	1,17 ± 0,00
SK678	0,19 ± 0,09	0,58 ± 0,00	0,07 ± 0,00	1,17 ± 0,00	37,6 ± 0,00	0,58 ± 0,00	1,17 ± 0,00	1,17 ± 0,00
SK1056	0,24 ± 0,09	0,58 ± 0,00	2,34 ± 0,00	0,29 ± 0,00	37,6 ± 0,00	0,58 ± 0,00	2,34 ± 0,00	0,58 ± 0,00

<sup>a</sup>Crescimento:  $A_{550nm} = /> 1,0$ . <sup>b</sup>As médias correspondem a valores obtidos em três experimentos independentes.

referência SK36 e identificação de regiões polimórficas.

- d) Demarcação de domínios funcionais utilizando o software *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART - <http://smart.embl-heidelberg.de/>) para assim, investigar se as mutações estão localizadas em regiões funcionais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 3 mostra os valores de CIM determinados nas cepas de *S. sanguinis* estudadas, para cada um dos antibióticos testados. Os valores de CBM foram iguais aos valores de CIM para todos os antibióticos, com exceção da amoxicilina para a cepa SK330 e dalbavancina para SK115, as quais demonstram um valor de CBM um pouco mais elevado que o de CIM ( $0,58 \pm 0,00$  e  $0,58 \pm 0,51$ , respectivamente). Entre as cepas, a SK1056, SK678 e SK353 foram as que se mostraram menos sensíveis a um maior número de antibióticos. A SK1056, isolada da corrente sanguínea, apresentou maiores valores de CIM para cinco dos oito antibióticos testados (amoxicilina, vancomicina, eritromicina, daptomicina e dalbavancina). A cepa SK678, também isolada da corrente sanguínea, apresentou maiores valores de CIM para quatro antibióticos (amoxicilina, daptomicina, dalbavancina e metilina). A cepa SK353 apresentou maiores valores de CIM e CBM para quatro antibióticos (vancomicina, amoxicilina, metilina e dalbavancina). Apesar de não ser isolada da corrente sanguínea, SK353 demonstra alta capacidade de invadir células endoteliais e virulência em modelo de coelho de EI (Baker et al., 2018; Alves et al., 2022)

As proteínas sensoras de VicK das cepas *S. sanguinis* apresentam 449 a 450 aminoácidos (aa). Duas cepas (SK115 e SK160) apresentaram proteínas sem o aminoácido D-448. Mas comparações com os dados de suscetibilidade aos antibióticos, indicam que essa deleção não promoveu fenótipo de resistência. A cepa SK353 apresentou duas mutações de sentido trocado (W-320 por L e D-326 por N). A figura 1 ilustra o alinhamento da região de VicK, nas quais estas mutações foram identificadas. Um dado importante é que essas mutações se localizam dentro ou próximas do domínio funcional HATPase\_c, mostrado na figura 2. Este domínio promove a transferência de um grupo fosfato do ATP

```

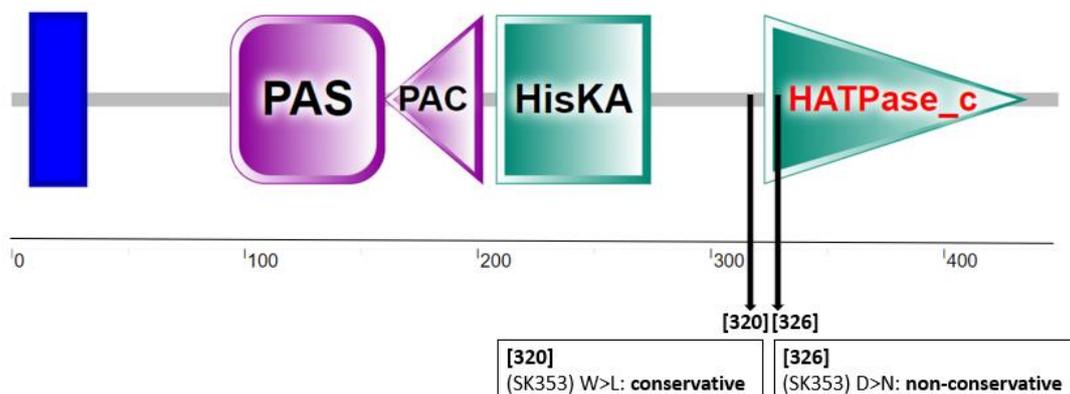
VicKSK36      TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK353    TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIVEIDTNKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK72     TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK330   TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK678   TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK1056  TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK49    TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK115   TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
VicKSK160   TNFTAFITFILNRFDKIKNQDETKKYEIIRDYPITPIIWEIDTDKLTQVIDNIMETNNAI
*****

VicKSK36      KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK353    KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK72     KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK330   KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK678   KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK1056  KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK49    KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK115   KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
VicKSK160   KYSPDGGTITVSIKTTDEQLILSIADEGLGIPKQDLPKIFDRFYRVDKARSRAQGGTGLG
*****

VicKSK36      LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDDI
VicKSK353    LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDDI
VicKSK72     LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDDI
VicKSK330   LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDDI
VicKSK678   LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDDI
VicKSK1056  LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDDI
VicKSK49    LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDDI
VicKSK115   LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDI
VicKSK160   LAIAKEIIKQHGFIAWSEYGVGSTFTIVLPYENDGVRDDDDWNEDI
*****

```

Figura 1. Representação esquemática do alinhamento múltiplo de parte das sequências de VicK (posição 283 a 449) das cepas estudadas (identificadas à esquerda de cada sequência), usando a ferramenta CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). A região funcional da proteína VicK (HATPase\_c) está destacada em verde ciano. Os polimorfismos detectados são destacados em amarelo. A cepa SK36 foi utilizada como referência para identificação das mutações.





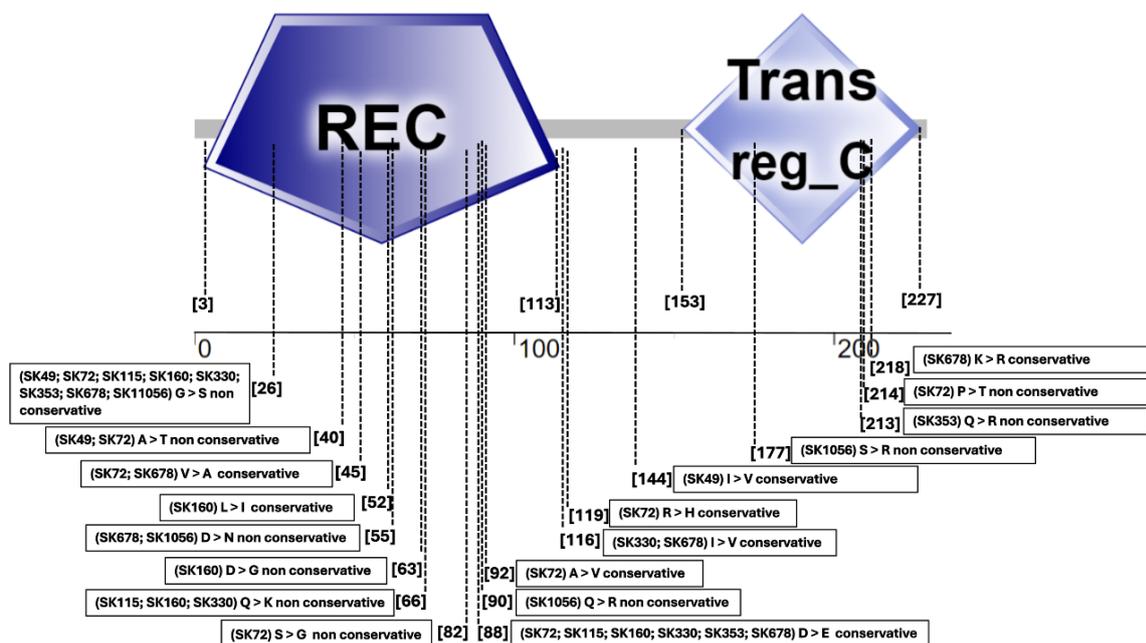


Figura 4. Representação esquemática dos polimorfismos presente na proteína CovR. O software Simple Modulant Architecture Research Tool (SMART - <http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi utilizado para identificar os domínios funcionais desta proteína.

## CONCLUSÕES

Dessa forma, nenhum polimorfismo foi detectado em VicR entre as cepas de *S. sanguinis*, compatível com seu papel essencial para a viabilidade da bactéria.

A cepa SK353 resistente a múltiplos antibióticos apresentou polimorfismos em regiões funcionais da proteína sensora VicK, indicando potencial influência deste polimorfismo no fenótipo de multirresistência.

O regulador CovR é altamente polimórfico na espécie *S. sanguinis*, sendo que cepas multirresistentes a antibióticos albergam polimorfismos em sítio de fosforilação chave para sua função reguladora.

## BIBLIOGRAFIA

Alves LA, Salvatierra GC, Freitas VA, Höfling JF, Bastos DC, Araujo TLS, Mattos-Graner RO. Diversity in Phenotypes Associated With Host Persistence and Systemic Virulence in *Streptococcus sanguinis* Strains. *Front Microbiol.* 2022 Apr 18;13:875581

Baker, S. P., Nulton, T. J., and Kittena, T. (2018). Genomic, phenotypic, and virulence analysis of *Streptococcus sanguinis* oral and infective-endocarditis isolates. *Infect. Immun.* 87:e00703-18. doi: 10.1128/IAI.00703-18

Gusa AA, Gao J, Stringer V, et al. Phosphorylation of the group A Streptococcal CovR response regulator causes dimerization and promoter-specific recruitment by RNA polymerase. *J Bacteriol.* 2006;188 (13):4620–4626.

Kreth, J., Giacaman, R. A., Raghavan, R., and Merritt, J. (2017). The road less traveled – defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. *Mol. Oral Microbiol.* 32, 181–196. doi: 10.1111/omi.12170

Mattos-Graner RO, Duncan MJ (2017). Two-component signal transduction systems in oral bacteria. *J. Oral Microbiol.*, 9(1), 1400858.

Moraes JJ, Stipp RN, Harth-Chu EN, Camargo TM, Höfling JF, Mattos-Graner RO (2014). Twocomponent system VicRK regulates functions associated with establishment of *Streptococcus sanguinis* in biofilms. *Infect. Immun.*, 82(12), 4941-4951.

Oliveira LT, Alves LA, Harth-Chu EN, Nomura R, Nakano K, Mattos-Graner RO. VicRK and CovR polymorphisms in *Streptococcus mutans* strains associated with cardiovascular infections. *J Med Microbiol.* 2021 Dec;70(12).