



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Análise da participação de proteínas de parede celular de *Streptococcus sanguinis* na hidrofobicidade e agregação mediada por soro humano.

Maria Fernanda Zaccharias Okuyama¹; Meire Ellen Ligia Sommer Brambila¹; Eduardo Martinelli Franco¹; Livia Araújo Alves²; Renata de Oliveira Mattos-Graner¹.

¹ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) ² Universidade Cruzeiro do Sul (UNICSUL)

Resumo

Streptococcus sanguinis é uma espécie pioneira dos dentes comumente envolvida em endocardite infecciosa, a qual expressa proteínas de parede celular potencialmente envolvidas na ligação a componentes séricos e bacterianos. O objetivo deste projeto foi investigar a participação dos genes de *S. sanguinis* que codificam proteínas de parede celular, *srtA*, *swan* e *srpA*, na hidrofobicidade de superfície, auto-agregação e co-agregação bacteriana mediada pelo soro. Para isto, os fenótipos de hidrofobicidade e agregação foram comparados entre as cepas mutantes *knock-out* dos genes *srtA* (SKsrtA), *swan* (SKswan) ou *srpA* (SKsrpA) e a cepa parental (SK36). A hidrofobicidade de superfície foi mensurada através de ensaios de aderência ao hexadecano. A agregação bacteriana foi determinada nas cepas ressuspendidas em PBS com 20% de soro humano normal (SN), 20% de soro inativado (SI) ou sem soro (controle negativo). A influência do cálcio na agregação bacteriana foi também avaliada em suspensões adicionadas de CaCl₂ (0,6 mM). A co-agregação das cepas SK36 e respectivas mutantes com cepas de *S. mutans* (UA159 e OMZ175), *S. mitis* (NTCT12261, SK138) e *S. sanguinis* (SK115, SK160) foi avaliada nas mesmas condições. Uma redução significativa na hidrofobicidade e agregação mediada em SN e SI foi observado em SKsrtA em comparação com SK36 ($p < 0,05$). SKsrpA apresentou reduções na agregação em SI ($p < 0,05$) e na co-agregação com a cepa SK138, mas não teve alterações na hidrofobicidade. A mutante SKswan não mostrou alterações significativas na hidrofobicidade ou agregação. Estes dados mostram que enquanto *srtA* é essencial para a hidrofobicidade de superfície, *srpA* contribui para os fenótipos de agregação e co-agregação mediada por fatores séricos.

Palavras chaves: *Streptococcus sanguinis*, hidrofobicidade, agregação, co-agregação, soro humano.

Introdução

Streptococcus sanguinis é uma espécie comensal abundante da cavidade bucal de humanos capaz de colonizar de forma pioneira as superfícies dentárias, favorecendo a homeostase dos biofilmes microbianos bucais (revisado por Kreth, 2017). Como colonizadora pioneira dos dentes, a espécie *S. sanguinis* possivelmente apresenta maior capacidade de interagir e/ou sobreviver a fatores do soro humano, os quais são abundantes no fluido gengival crevicular.

Consistentemente, *S. sanguinis* é mais resistente à ativação do sistema complemento, importante fator sérico da imunidade inata (Alves et al., 2022). Uma característica peculiar de *S. sanguinis*, quando comparada a outras espécies de estreptococos da cavidade bucal e orofaringe, é o grande número de proteínas ancoradas à parede celular (Nobbs & Kreth, 2019).

O ancoramento destas proteínas ao peptidoglicano é catalizado pela transpeptidase de

membrana, sortase A (Jacobitz et al., 2017). Duas proteínas alvo de sortase A de *S. sanguinis*, estão potencialmente envolvidas no escape a PMN humanos e/ou na interação com componentes salivares e/ou séricos, a nuclease de parede celular Swan (de *streptococcal wall-anchored nuclease*) (Morita et al., 2014) e a adesina SrpA (serine-rich protein A).

O objetivo deste projeto foi investigar a participação dos genes *srtA*, *swan* e *srpA* de *S. sanguinis* na hidrofobicidade de superfície, auto-agregação e co-agregação com estreptococos bucais mediada ou não por soro humano.

Material e Métodos

Cepas bacterianas e condições de cultivo.

As cepas bacterianas estudadas incluíram a cepa *S. sanguinis* SK36, cujo genoma é conhecido (Xu et al., 2007) e respectivas mutantes isogênicas do gene *srtA*, *swan* e *srpA*. Estas cepas mutantes (respectivamente designadas SKsrtA, SKswan e SKsrpA) são resistentes à eritromicina. Além disso, as cepas selvagens de *S. sanguinis* (SK115, SK160). Cepas de outras espécies de estreptococos comuns nas fases iniciais de formação dos biofilmes bucais incluíram as cepas de *Streptococcus mitis* NTCT12261 e SK138 e as cepas de *Streptococcus mutans* UA159 e OMZ175. As cepas mutantes complementadas com cópia episomal dos genes inativados (+) foram utilizadas como controle.

Todas as cepas foram semeadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (acrescido de eritromicina a 5 µg/ml, quando necessário) e incubadas a 37 °C, sob atmosfera com 10% CO₂ por 48 h (Alves et al., 2022). Colônias isoladas destas culturas foram inoculadas em 5 ml de caldo BHI com ou sem eritromicina (BHIm) e incubadas (37°C, 10% CO₂) por 18h. Em seguida, inóculos destas culturas com absorbâncias ajustadas foram transferidos para meio BHI e incubadas até atingirem A_{550nm} 0,7 (Alves et al., 2022), para utilização nos diferentes experimentos.

Análise da hidrofobicidade de superfície.

A hidrofobicidade de superfície das cepas mutantes e selvagens foram avaliadas, conforme descrito por Rosenberg et al. (1981), com algumas modificações (Duque et al., 2011). Após atingirem a fase exponencial de crescimento, as cepas foram separadas por centrifugação e lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em tampão magnésio-fosfato-uréia (MUF) para uma absorbância (A_{550nm}) igual a 0,900. Volumes das suspensões bacterianas (4 ml) foram acrescidos de 400 µl de *n*-hexadecano (Sigma-Aldrich). As amostras foram pré-incubadas a 30°C por 15 min. sob atmosfera de 10% de CO₂, por duas vezes, para separação da fase aquosa inferior à fase de hexadecano.

A incubação foi então continuada e os procedimentos foram repetidos para determinação da aderência ao hexadecano após 45 e 60 min. de incubação. Três experimentos independentes foram realizados.

Agregação mediada pelo soro humano.

Bactérias em fase exponencial de crescimento foram separadas por centrifugação e lavadas por duas vezes em PBS e ressuspensas para uma A_{660nm}=1,0 no mesmo tampão. Volumes de 1 ml destas suspensões foram acrescidas de soro humano normal (SN), ou de soro inativado pelo calor (SI) (56°C por 30 min.), ou PBS (controle negativo). As absorbâncias (A_{550nm}) destas suspensões foram então determinadas após 0 (logo após a suspensão), 90, 120, 150, 180 e 210 min. de incubação sob temperatura ambiente. Uma vez que a agregação bacteriana mediada pelo soro ou saliva é dependente de cálcio, ensaios paralelos foram realizados com as mesmas suspensões de bactérias em PBS acrescido de CaCl₂ numa concentração final de 0,6 mM (PBS-CaCl₂) (Rundegren & Ericson, 1981). O total de três experimentos independentes foram realizados para cada cepa.

Ensaio de co-agregação bacteriana na ausência e presença de soro humano.

Inicialmente, foi determinada a co-agregação da cepa SK36 com cepas de *S. mutans* (UA159 e OMZ175), *S. mitis* (NTCT12261, SK138) e *S. sanguinis* (SK115, SK160). Resumidamente, após atingirem a fase exponencial de crescimento, as cepas foram separadas por centrifugação, lavadas por duas vezes em PBS e re-suspensas no mesmo tampão suplementado com SN, ou SI para uma A_{550nm} igual a 1,0. Volumes de 0,5 ml das suspensões de cada uma das duas bactérias do teste de agregação foram então misturados e incubados sob temperatura ambiente para a determinação visual da agregação por meio do estereomicroscópio no aumento de 20x, nos tempos 0 (logo após a suspensão) e 3h. Três ensaios independentes foram realizados. A seguir, uma cepa de cada espécie testada demonstrando maior agregação com SK36 foi selecionada para investigar a co-agregação com as cepas mutantes SKsrtA, SKswan e SKsrpA. Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente nesta sub-seção, utilizando-se a cepa parental SK36 como referência. Um total de três experimentos independentes foram realizados com cada uma das quatro cepas testadas (SK36, SKsrtA, SKswan e SKsrpA).

Resultados e Discussão

Análise de hidrofobicidade de superfície.

Observaram-se diferenças significativas nos perfis de hidrofobicidade entre as cepas testadas. A **figura 1** ilustra suspensões representativas das cepas

incubadas com hexadecano. Observa-se nesta figura que as fases aquosas das cepas SK36, UA159, SKSwan, SKswan+ e SKsrpA apresentaram padrões de turbidez semelhantes, enquanto que um claro aumento na turbidez da fase aquosa de SKsrta pôde ser detectado visualmente, indicando falta de aderência ao hexadecano (também ser visualizada pela transparência da fase hidrofóbica superior). Assim, a cepa mutante SKsrta apresentou significativa redução na hidrofobicidade, diferente das cepas SKswan e SKsrpA, cujas porcentagens de hidrofobicidade foram semelhantes à da cepa parental. Assim, diferente de *srtA*, os genes *swan* e *srpA* não influenciam significativamente na hidrofobicidade de superfície de *S. sanguinis*.

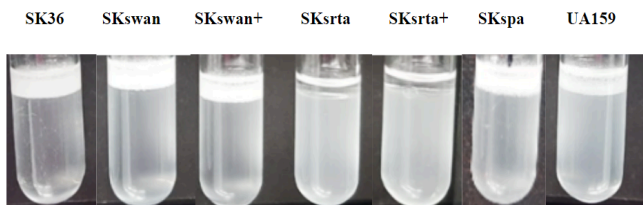


Figura 1: Imagens representativas das suspensões bacterianas em tampão MUF acrescido de hexadecano.

Agregação mediada pelo soro humano.

Observaram-se significativas diferenças na agregação entre as cepas nas diferentes soluções (PBS, 20% soro e 20% soro inativado). As reduções na absorbância das suspensões (como medida indireta da agregação) ao longo do tempo são ilustradas nas figuras 2, 3 e 4. Quanto maior a agregação, menor o valor de absorbância da suspensão, decorrente a formação de precipitado decantado nos tubos teste. Observa-se que a inativação do gene *SrpA* reduz drasticamente a agregação, principalmente em 20% de soro normal (SN) e 20% de soro inativado (SI); já que sua absorbância é significativamente maior do que a da cepa parental. O mesmo ocorre na cepa SKsrta e SKsrta+, porém com intensidade menor. Assim *srtA* tem pequeno efeito na agregação soro-dependente. A cepa SKswan demonstrou perfil de agregação semelhante ao de SK36, não contribuindo para a agregação. A presença do cloreto de cálcio não alterou significativamente a agregação bacteriana.

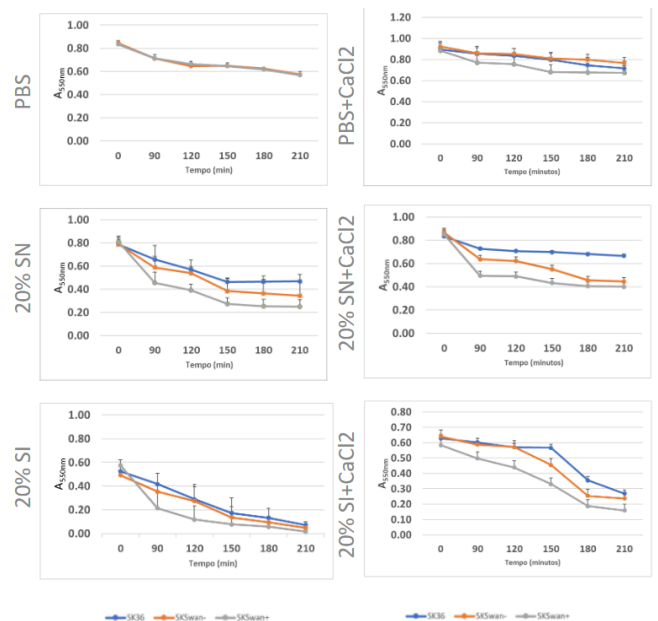


Figura 2: Perfis de agregação das cepas mutantes SKswan- e SKswan+ com a cepa parental SK36. As reduções das medidas de A_{550nm} ao longo do tempo refletem as intensidades de agregação. Os símbolos indicam médias de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as cepas.

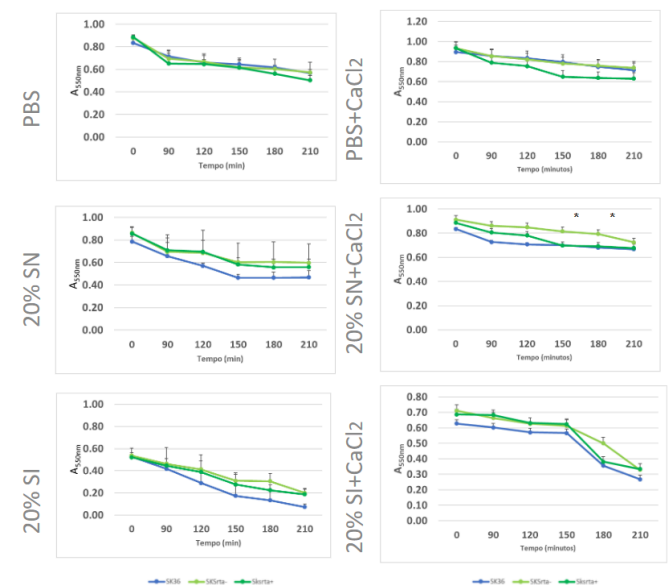


Figura 3: Perfis de agregação das cepas mutantes SKsrta- e SKsrta+ com a cepa parental. As reduções das medidas de A_{550nm} ao longo do tempo refletem as intensidades de agregação. Os símbolos indicam médias de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Diferenças estatisticamente significantes em relação à cepa parental SK36: Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn (* $p < 0,05$).

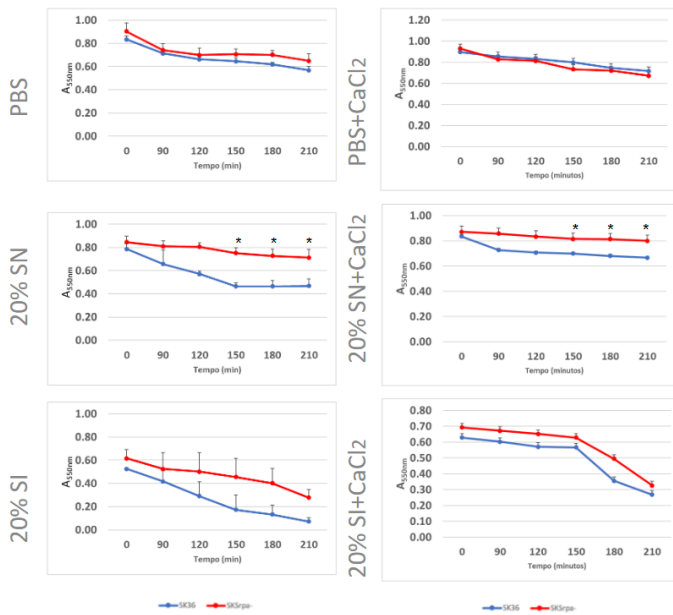


Figura 4: Perfis de agregação das cepas *S. sanguinis*. As reduções das medidas de A_{550nm} ao longo tempo refletem as intensidades de agregação. Os símbolos indicam médias de três experimentos independentes; as barras indicam os desvios padrão. Diferenças estatisticamente significantes em relação à cepa parental SK36: Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn (* $p < 0,05$).

Ensaio de co-agregação bacteriana na ausência e presença de soro humano.

A análise da co-agregação foi realizada com auxílio de estereomicroscópio, sob aumento de 20x. Imagens digitais representativas foram obtidas. Observa-se na **figura 5**, nítida co-agregação de SK36 com a cepa SK138 em soro inativado (SI). Entre as cepas de outras espécies, as cepas SK160 (*S. sanguinis*) e OMZ175 (*S. mutans*) também mostraram co-agregação detectável com SK36, sendo utilizadas para análises das cepas mutantes.

As análises de co-agregação das cepas mutantes, são ilustradas nas **figuras 6, 7 e 8**. Diferente de *srtA* e *swan*, a inativação de *srpA* reduziu claramente a co-agregação de SK36 com SK138 na presença de soro inativado. Deste modo, os genes estudados não estão relacionados à co-agregação de SK36 com as espécies testadas.

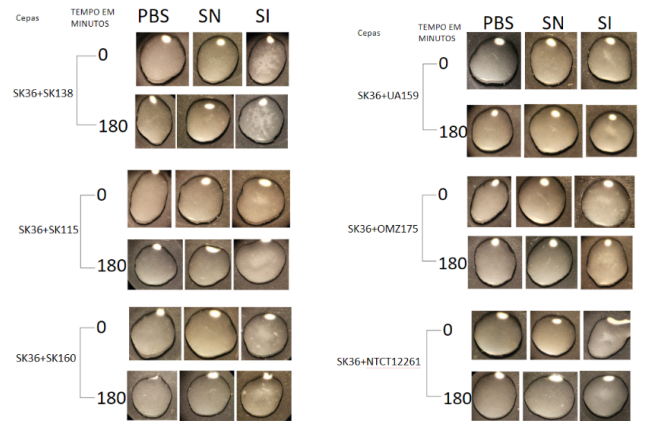


Figura 5: Imagens representativas das suspensões bacterianas na presença de PBS, de PBS com 20% de soro normal (SN) ou com 20% de soro inativado (SI), logo após a suspensão (tempo 0) e após 180 min. de incubação. As cepas co-incubadas com SK36 estão indicadas à esquerda das respectivas imagens.

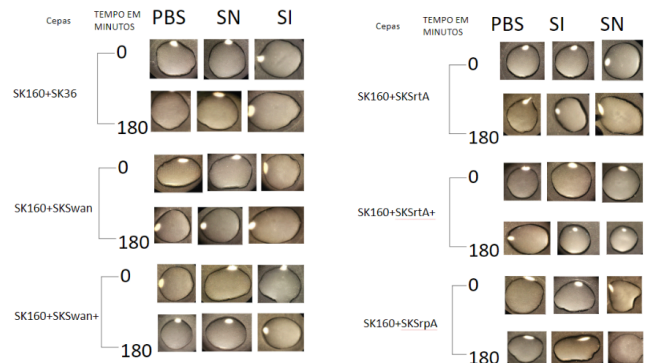


Figura 6: Imagens representativas das suspensões bacterianas em PBS, PBS com 20% de soro normal (SN) ou com 20% de soro inativado (SI), logo após a suspensão (tempo 0) e após 180 min. de incubação. As cepas co-incubadas estão indicadas à esquerda das respectivas imagens.

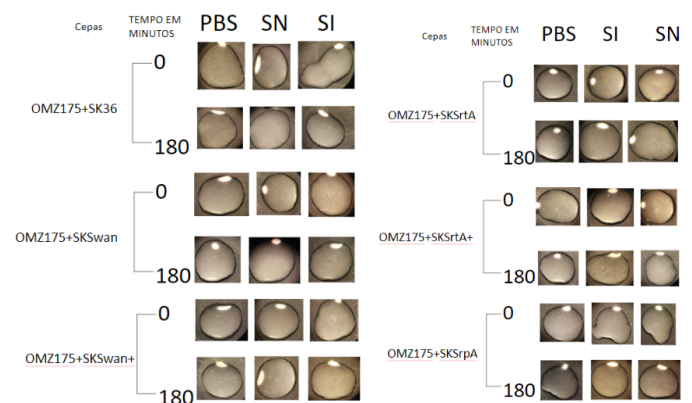


Figura 7: Imagens representativas das suspensões bacterianas em PBS, PBS com 20% de soro normal (SN) ou com 20% de soro inativado (SI), logo após a suspensão (tempo 0) ou após 180 min. de incubação. As cepas co-incubadas estão indicadas à esquerda das respectivas imagens.

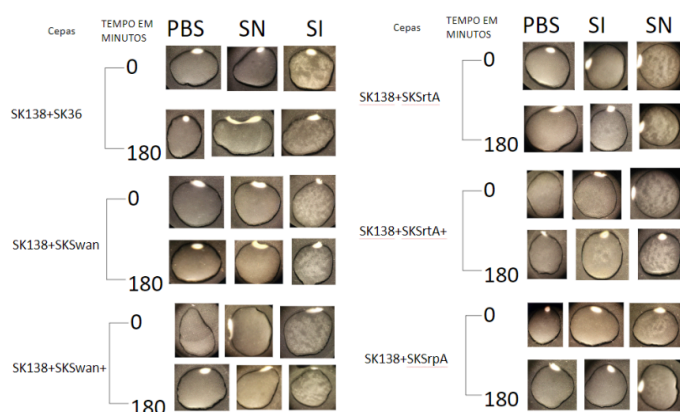


Figura 8: Imagens representativas das suspensões bacterianas em PBS, PBS com 20% de soro normal (SN) ou com 20% de soro inativado (SI), logo após a suspensão (tempo 0) ou após 180 min. de incubação. As cepas co-incubadas estão indicadas à esquerda das respectivas imagens.

Conclusão

Os genes *srtA*, *swan* e *srpA* desempenham funções específicas nos fenótipos de hidrofobicidade, auto-agregação e co-agregação bacteriana.

O gene *srtA*, mas não *swan* e *srpA*, é requerido para a hidrofobicidade de superfície de *S. sanguinis*.

O gene *srpA* modula a auto-agregação de *S. sanguinis* mediada pelo soro, assim como a co-agregação com cepas específicas de *Streptococcus mitis*.

O gene *swan* não influencia na hidrofobicidade de superfície ou em fenótipos de agregação bacteriana.

Referências Bibliográficas

1. Camargo TM, Stipp RN, Alves LA, Harth-Chu EN, Höfling JF, Mattos-Graner RO. Novel Two-Component System of *Streptococcus sanguinis* Affecting Functions Associated with Viability in Saliva and Biofilm Formation. *Infect Immun.* 2018 Mar 22;86(4):e00942-17. doi: 10.1128/IAI.00942-17.
2. 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. doi: 10.3389/fmicb.2022.875581.
3. Rosenberg M, Perry A, Bayer EA, Gutnick DL, Rosenberg E, Ofek I. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect Immun.* 1981 Jul;33(1):29-33. doi: 10.1128/iai.33.1.29-33.1981.
4. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell

surface characteristics. *Infect Immun.* 2011 Feb;79(2):786-96. doi: 10.1128/IAI.00725-10.

5. Moraes JJ, Stipp RN, Harth-Chu EN, Camargo TM, Höfling JF, Mattos-Graner RO. Two-component system VicRK regulates functions associated with establishment of *Streptococcus sanguinis* in biofilms. *Infect Immun.* 2014 Dec;82(12):4941-51. doi: 10.1128/IAI.01850-14. Epub 2014

6. Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, Hayashi M, Hamada S, Sumitomo T, Kawabata S. Cell wall-anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to escape from neutrophil extracellular trap-mediated bacteriocidal activity. *PLoS One.* 2014 Aug 1;9(8):e103125. doi: 10.1371/journal.pone.0103125.

7. Turner LS, Kanamoto T, Unoki T, Munro CL, Wu H, Kitten T. Comprehensive evaluation of *Streptococcus sanguinis* cell wall-anchored proteins in early infective endocarditis. *Infect Immun.* 2009 Nov;77(11):4966-75. doi: 10.1128/IAI.00760-09. Epub 2009