



ANÁLISE DA SELEÇÃO DE VARIANTES DE COLÔNIAS PEQUENAS DE *STREPTOCOCCUS SANGUINIS* EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA

Palavras-Chave: *Streptococcus sanguinis*; *Small colony variants* (SCVs); estresse intracelular.

Autores (as):

Carina Albertasi Costacurta, FOP - UNICAMP; Thais Romanini Furlan, FOP - UNICAMP; Meire Ellen Ligia Sommer, FOP - UNICAMP; Eduardo Martinelli Franco, FOP - UNICAMP; Prof^ª. Dr^ª. Renata de Oliveira Mattos Graner, FOP - UNICAMP.

1. INTRODUÇÃO:

Streptococcus sanguinis é uma espécie bacteriana comensal abundante da cavidade bucal de humanos, reconhecida como importante patógeno oportunista de infecções cardiovasculares, incluindo-se endocardite infecciosa (EI) e aterosclerose (Alves *et al.*, 2022). Há, entretanto, entre cepas desta espécie, grande diversidade de fenótipos associados à virulência sistêmica, como a susceptibilidade à deposição de proteínas do sistema complemento e opsonofagocitose por neutrófilos, assim como persistência no interior de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) (Alves *et al.*, 2022).

Variantes de colônias pequenas (SCV de *small colony variants*) são linhagens com resistência a antibióticos altamente persistentes, que emergem sob condições adversas e caracteristicamente, formam colônias de tamanho atipicamente pequeno em meio sólido, quando comparadas à cepa parental. Em *Streptococcus pneumoniae*, a formação de SCVs está associada à produção de H₂O₂ por esta espécie. Outra espécie bucal produtora de H₂O₂, *S. sanguinis*, é comumente envolvida em infecções cardiovasculares persistentes. Entretanto, a formação de SCVs por *S. sanguinis* é desconhecida. A produção de H₂O₂ por *S. sanguinis* requer a expressão de *spxB*, gene que codifica a enzima piruvato oxidase convertora de O₂ e fosfato inorgânico em H₂O₂, CO₂ e acetil fosfato. Os objetivos deste projeto são investigar a geração de SCVs pela cepa *S. sanguinis* SK36 após sobrevida no interior de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC, de *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) e investigar a contribuição de *spxB* para este processo. Para isto, uma linhagem parental de *S. sanguinis* (SK36) foi comparada com cepa *knockout* de *spxB* (SKspxB) quanto à formação de SCVs após sobrevida no interior de células endoteliais HUVECs. Para isto, HUVEC foram desafiadas com SK36 e SKspxB em ensaios de proteção antibiótica e as bactérias persistentes no interior destas células foram contadas e analisadas quanto à morfologia, para verificação da frequência de seleção SCVs. Os resultados deste projeto podem revelar um importante mecanismo de persistência de *S. sanguinis* em infecções cardiovasculares, a formação de SCV, além de indicar a contribuição de *spxB* para este processo.

2. METODOLOGIA:

2.1 Cepas estudadas e condições de crescimento bacteriano. A cepa *S. sanguinis* SK36 foi utilizada como referência por ser a mais caracterizada em estudos genéticos e fenotípicos e pelo seu genoma conhecido (Kreth *et al.*, 2017). Além disso, SK36 apresenta fenótipos de invasão de HUVEC semelhantes aos de cepas invasivas de *S. sanguinis* (Alves *et al.*, 2022). A cepa mutante *knockout* de *spxB* (SKspxB) estudada foi construída a partir de SK36 em projetos relacionados a esta proposta (Tese de Doutorado, Victor Aragão Abreu de Freitas - auxílios FAPESP: proc. 2018/02054-4 e 2018/12248-0). A mutante complementada com cópia episomal de *spxB* (SKspxB+), construída no mesmo estudo, foi utilizada como controle. As cepas foram mantidas a -70°C e reativadas a partir de estoques congelados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck Labs, Alemanha). Após o crescimento (24h; 37°C; 10% CO₂), colônias isoladas foram inoculadas em 5 ml de caldo BHI e incubadas sob as mesmas condições durante 18h. A cepa mutante (contendo o gene de resistência à eritromicina) foi reativada em BHI suplementado com este

antibiótico e sub-cultivada em BHI sem antibiótico. A cepa complementada SKsxpB+ foi mantida em BHI acrescido de espectinomicina para manutenção do plasmídeo contendo *spxB*.

2.2 Células endoteliais HUVEC e condições de cultivo. As células de HUVEC incluídas neste projeto foram adquiridas da empresa ATCC (ATCC; CRL-4147) e foram mantidas em nitrogênio líquido, no laboratório da área de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral da FOP- UNICAMP. Estas células foram cultivadas em meio celular basal Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), inativado pelo calor, sendo mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ com troca de meio entre 24 a 48h, até atingir confluência celular de 70 a 80%. Para os ensaios de exposição a bactérias, as HUVEC foram cultivadas em meio basal DMEM suplementado com FBS e antibiótico, 50 mg/mL de penicilina e 15 mg/mL de gentamicina (Marin et al., 2001), sendo utilizadas nos ensaios quando entre 4 e 7 passagens.

2.3 Análise da invasão bacteriana em HUVEC em ensaio de proteção antibiótica. Os ensaios de invasão de *S. sanguinis* em HUVEC foram realizados como descrito em estudos anteriores em HUVEC (Alves *et al.*, 2022), com algumas modificações. Para otimizar a invasão bacteriana, as suspensões bacterianas foram previamente tratadas (a 37°C por 30 min.) com 20% de soro humano em PBS e a seguir, lavadas por 3 vezes em PBS. As HUVEC foram cultivadas em meio basal DMEM suplementado com FBS e antibiótico e semeadas em placas de cultura de 24 poços (Corning) (1×10^5 células/poço) até atingir aproximadamente 80% de confluência. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS pré-aquecido, adicionadas de 1 ml de suspensões de bactérias pré-tratadas com soro em meio DMEM isento de antibióticos (1×10^7 UFC/ml para MOI de 100:1) e a incubação continuada por 2h (37°C, atmosfera de 5% de CO₂) para a invasão bacteriana. A seguir, o meio de cultura foi removido e as HUVEC foram lavadas (três vezes com tampão PBS pré-aquecido) e incubadas por 1h com meio DMEM contendo antibióticos (50 mg/mL de penicilina e 15 mg/mL de gentamicina), para matar as bactérias extracelulares remanescentes. Após nova série de lavagens as HUVEC foram então lisadas por incubação com H₂O tipo I ultrapura fria (20 min., sob temperatura ambiente). Diluições em série (de 10^{-3} a 10^{-6}) destes lisados foram inoculadas em placas de ágar BHI, as quais foram incubadas por 48 h (37°C; 10% de CO₂), para contagem das bactérias intracelulares viáveis (UFC/ml) e análise das morfologias coloniais. As contagens bacterianas do inóculo inicial foram utilizadas como referência para o cálculo da porcentagem de bactérias intracelulares e também como referência para o tamanho colonial das cepas caracterizado como normal (sem submissão aos estresses do ambiente intracelular). Uma vez que o número de colônias por placa pode influenciar no tamanho colonial, foram selecionadas as diluições do pré-inóculo inicial (bactérias pré-tratadas com soro) e do lisado (bactérias do ambiente intracelular), das diluições que geraram cerca de 100 a 400 colônias.

2.4 Análise do diâmetro das colônias bacterianas para identificação de SVC das cepas de *S. sanguinis*. As bactérias do inóculo inicial (pré-tratadas com soro) e as intracelulares recuperadas em ágar BHI dos lisados de HUVEC, (obtidos como descrito no item 2.3), foram fotografadas e as respectivas imagens digitais utilizadas para a contagem e medição das colônias com auxílio do software ImageJ (<https://imagej.net/ij/index.html>). Em primeiro lugar, foi selecionada uma colônia representativa em cada placa para a mensuração manual de seu diâmetro com auxílio de paquímetro. Esta medição foi utilizada como medida de referência para análise dos tamanhos coloniais de todas as colônias da mesma placa aplicando-se o software ImageJ, através do qual foram geradas as planilhas com as medidas de diâmetro de todas as colônias obtidas em cada placa identificadas por números. Artefatos das imagens identificados como colônias pelo software foram corrigidos manualmente nas planilhas geradas. Gráficos de box plot foram gerados para análise da distribuição de colônias por tamanho (diâmetro em mm). As colônias bacterianas foram agrupadas em três categorias com base no seu tamanho: colônias de tamanho normal (NC, de *normal colony*), colônias pequenas (SC, de *small colony*) e colônias grandes (BC, de *big colony*). Essa classificação foi estabelecida a partir das colônias obtidas do grupo de referência (inóculo inicial pré-tratado com soro e não exposto às células HUVEC). Considerou-se como NC as colônias com os tamanhos mais frequentes (observados em 80% das colônias), enquanto que colônias correspondentes às 10% menores e maiores foram classificadas, respectivamente, como SC e BC. Os critérios definidos com base nesse grupo controle foram então aplicados às colônias recuperadas do interior de HUVEC, permitindo a análise das alterações morfológicas induzidas pelo ambiente intracelular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Figura 1 ilustra culturas de *S. sanguinis* SK36 em ágar BHI e respectivos dados de análise do tamanho colonial obtidas a partir de bactérias pré-tratadas com soro a 20% e lavadas com PBS (inóculo inicial) e colônias formadas por bactérias recuperadas do interior de HUVEC. As culturas utilizadas para as análises de tamanho colonial foram aquelas correspondentes à diluições que geraram em média 100 a 400 colônias, uma vez que a densidade celular pode interferir no tamanho colonial. Com base nestas análises, as colônias de SK36 do pré-inóculo (Figura 1A e B) com diâmetro entre 0,250 e 0,599 mm foram classificadas como NC. Desta forma, colônias com diâmetro inferior a 0,249 foram classificadas como SC (variação entre 0,001 e 0,249 mm) e colônias com diâmetro maior do que 0,600 mm foram classificadas como BC (variação entre 0,600 e 0,930 mm). Os mesmos critérios de classificação foram então aplicados para classificação das colônias recuperadas do interior de HUVEC (Figura 1D e E). A frequência de NC, SC e BC foi então comparada entre os grupos de bactérias do pré-inóculo e das bactérias intracelulares (Tabela 1). Como mostrado na Tabela 1, amostras recuperadas de HUVEC apresentaram frequência de geração de SC duas vezes maior do que as amostras de pré-inóculo, sugerindo que os estresses do meio intracelular de HUVEC seleccione SCV. A distribuição em quartis das colônias do pré-inóculo e do ambiente intracelular também foi analisada em gráficos de *box plot* (Figura 2). Uma vez que a própria pré-exposição ao soro a 20% requerida para otimizar a invasão de HUVEC possa representar um estresse, cerca de 10% das colônias recuperadas do pré-inóculo também geraram SC. Para esclarecer se este pequeno número de SCV foi decorrente da exposição ao soro, pretendemos definir o tamanho colonial de SK36 em meio BHI ágar em culturas obtidas da mesma forma, mas em tratamento sem soro.

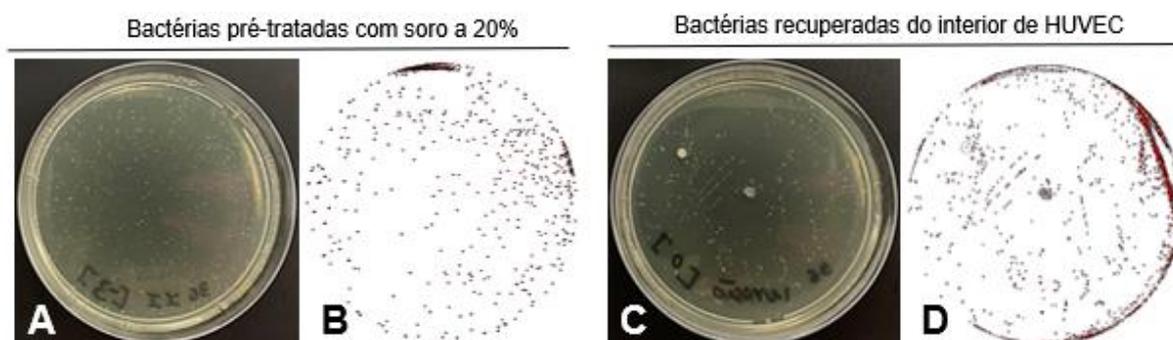


Figura 1. Análise comparativa do tamanho colonial de *S. sanguinis* antes e após persistência no interior de células endoteliais. A) Cultura em ágar BHI (37°C, 48h) da cepa SK36 pré-tratada com soro humano e utilizada como inóculo das células HUVEC. B) Desenho gerado a partir de imagem digital da cultura em ágar (A) para identificação e mensuração das colônias recuperadas. C/D) Imagem original e desenho da cultura de células SK36 obtidas do interior de células HUVEC nos ensaios de proteção antibiótica.

Tabela 1. Distribuição de colônias de *S. sanguinis* SK36 segundo o tamanho, em amostras pré-tratadas com soro antes e após a invasão de HUVEC.

Tratamento	N (%) de colônias de diferentes tamanhos [diâmetro em mm]			Total
	SC [0,001 a 0,249]	NC [0,250 a 0,599]	BC [0,600 a 0,930]	
Pré-exposição a HUVEC ^a	26 (10,1)	206 (80,2)	25 (9,7)	257
Recuperadas de HUVEC	59 (19,9) *	232 (78,4)	5 (1,7)	296
Total	85	232	30	553

^a O número de colônias nesta condição foi determinado na amostra diluída a 10^{-3} para obtenção de placas com número equivalente de colônias. * Teste de qui-quadrado: $p < 0,01$.

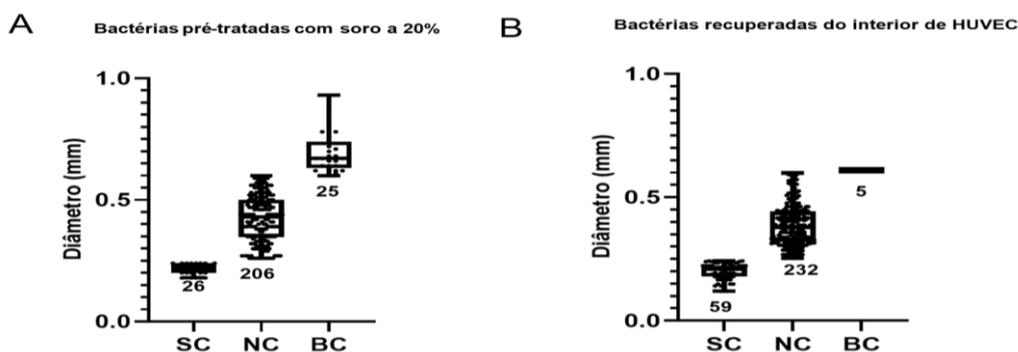


Figura 2. Análise de *box plot* da distribuição de colônias de SK36 por diferentes categorias de tamanho. A) Distribuição das colônias obtidas de amostras do pré-inóculo tratado com 20% de soro. B) Distribuição das colônias obtidas de lisados de HUVEC (ambiente intracelular).

O efeito na inativação de *spxB* na frequência de geração de SCV foi então avaliada de forma semelhante à da cepa parental SK36. Assim, foram comparados os tamanhos de colônias de SKspxB do pré-inóculo (pré-tratado com soro, mas não exposto às HUVEC) com as colônias da mesma cepa recuperada do interior de HUVEC. O mesmo foi realizado com a cepa SKspxB complementada (SKspxB+). A Figura 3 ilustra as culturas em BHI ágar e respectivas análises do tamanho colonial. Observou-se que as colônias de SKspxB do pré-inóculo tem tamanho mais comum variando entre 0,900 a 1,499 mm (intervalo considerado para classificação de NC). As colônias com o diâmetro entre 0,001 e 0,899 mm foram classificadas como small colonies, enquanto as que apresentaram diâmetro maior que 1,500 mm foram classificadas como big colonies. Os fenótipos de tamanho colonial de SKspxB+ não foram recuperados (dados não mostrados), o que é compatível com os dados obtidos em estudos prévios de nosso grupo (Alves *et al.*, 2023), indicando pobre expressão de diferentes genes de virulência no ambiente intracelular, o que comprometeria a expressão da cópia episomal de *spxB* em SKspxB+. A Figura 4 ilustra a distribuição das colônias de diferentes categorias de tamanho nas amostras de pré-inóculo e em lisados de HUVEC das cepas SKspxB e SKspxB+.

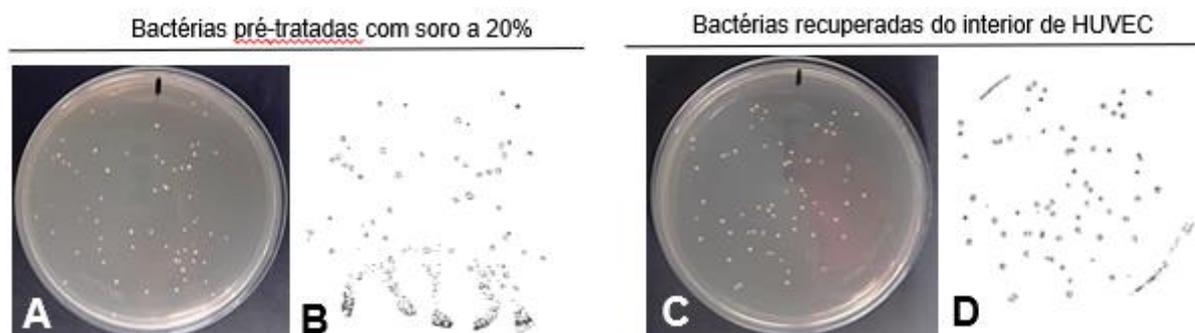


Figura 3. Análise comparativa do tamanho colonial da mutante isogênica de *spxB* de *S. sanguinis* antes e após persistência no interior de HUVEC. A) Cultura em ágar BHI (37°C, 48h) da cepa SKspxB pré-tratada com soro humano e utilizada como inóculo das células HUVEC. B) Desenho gerado a partir de imagem digital da cultura em ágar (A) para identificação e mensuração das colônias recuperadas. C/D) Imagem original e desenho da cultura de células SKspxB obtidas do interior de células HUVEC nos ensaios de proteção antibiótica. Uma vez que SKspxB é defectiva na invasão de HUVEC, os lisados foram concentrados 5 vezes para recuperação de colônias. A diluição do pré-inóculo gerando número de colônias equivalentes foi de 1×10^{-3} .

Tabela 2. Distribuição de colônias de *S. sanguinis* SKspxB segundo o tamanho, em amostras pré-tratadas com soro antes e após a invasão de HUVEC.

Tratamento	N (%) de colônias de diferentes tamanhos [diâmetro; mm]			Total
	SC [0,001 a 0,899]	NC [0,900 a 1,499]	BC [1,500 a 2,000]	
Pré-exposição a HUVEC ^b	4 (7,8)	36 (70,6)	11 (21,6)	51
Recuperadas de HUVEC	19 (29,2)	45 (69,2)	1 (1,5)	65
Total	23	81	12	116

^b O número de colônias nesta condição foi determinado na amostra diluída a 10^{-3} para obtenção de placas com número equivalente de colônias.

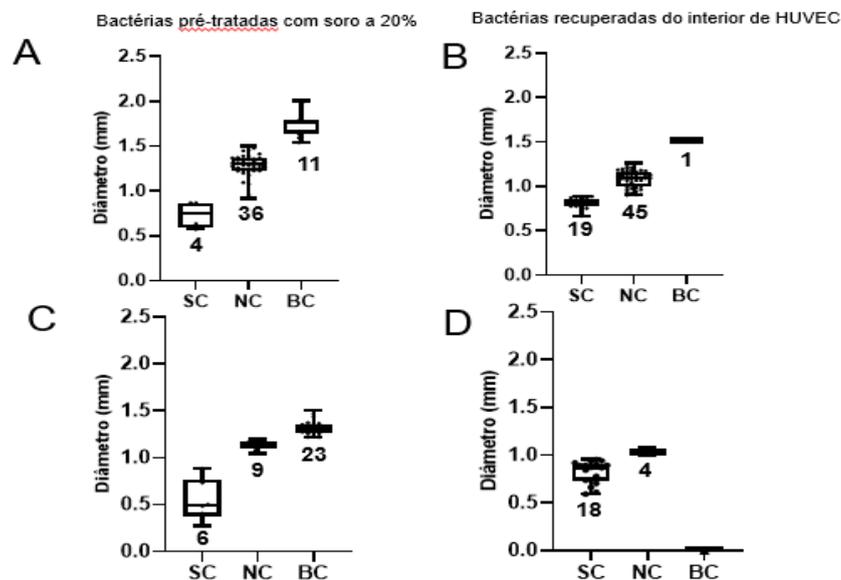


Figura 4. Análise de box plot da distribuição de colônias de *SKspxB* e *SKspxB+* por diferentes categorias de tamanho. A,C) Distribuição das colônias obtidas de amostras do pré-inóculo tratado com 20% de soro. B,D) Distribuição das colônias obtidas de lisados de HUVEC (ambiente intracelular).

Com o objetivo de confirmar o fenótipo de SCV nas colônias intracelulares viáveis previamente classificadas como colônias pequenas, três colônias representativas de cada morfotipo identificado serão subcultivadas em placas de ágar BHI por um período de 48 a 72 horas. Considerando que SCVs apresentam, de maneira característica, crescimento mais lento e menor taxa de autólise em comparação às cepas parentais (Singh et al., 2017), três variantes SCV derivadas das cepas SK36 e *SKspxB* serão comparadas às respectivas cepas originais quanto às curvas de crescimento em meio planctônico e às curvas de autólise. Essa etapa ainda será executada conforme o cronograma previsto, e os resultados serão incluídos na apresentação do Congresso de Iniciação Científica da Unicamp.

4. CONCLUSÕES:

Os resultados deste estudo demonstram que houve um aumento significativo na frequência de variantes de colônias pequenas (SCVs) de *Streptococcus sanguinis* após a exposição ao ambiente intracelular de células endoteliais humanas, em comparação com a condição pré-tratamento com soro humano. Esse achado sugere que o ambiente intracelular impõe uma pressão seletiva capaz de favorecer o desenvolvimento e a persistência de SCV. Dada a associação conhecida entre SCVs e maior capacidade de evasão imunológica, persistência intracelular e potencial de infecção crônica, nossos dados reforçam a relevância dessas variantes para a patogênese de *S. sanguinis*.

5. BIBLIOGRAFIA:

- Allegrucci M. et al. Increased mutation frequency under biofilm growth induces *S. pneumoniae* variants. *J Bacteriol.* 2008;190(19):6330–9.
- Alves LA. et al. PepO and CppA modulate *S. sanguinis* complement susceptibility. *Virulence.* 2023;14(1).
- Kreth J. et al. Defining molecular commensalism with *S. sanguinis*. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(3):181–96.
- Tengan LA, Mattos-Graner RO. Projeto FAPESP: sistemas VicRK e CovR na resistência de *S. mutans* e *S. sanguinis*. Proc. n° 2022/16831-8.
- Mashayamombe M. et al. Subpopulations in *S. aureus* provide antibiotic tolerance. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(2):406.
- Moraes JJ. et al. VicRK regulates biofilm establishment in *S. sanguinis*. *Infect Immun.* 2014;82(12):4941–51.
- Proctor R. et al. Small colony variants and persistent infections. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:295–305.
- Ryder VJ. et al. Increased mutability of staphylococci in biofilms due to oxidative stress. *PLoS One.* 2012;7(10):e47695.
- Stipp RN. et al. CovR and VicRK regulate biofilm genes in *S. mutans*. *PLoS One.* 2013;8(3):e58271.
- Subramanian K. et al. From colonizer to intracellular pathogen: *S. pneumoniae*. *Cell Microbiol.* 2019;21(11):e13077.
- Tuchscher L. et al. SCVs and virulence factor expression in *S. aureus*. *Front Microbiol.* 2020;11:1028.
- Marin V. et al. Protocol for culturing human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods.* 2001;254(1–2):183–90.