



Exposição contínua à clorexidina aumenta a expressão de genes relacionados à competência e estado metabólico em *Streptococcus mutans*

Palavras-Chave: Clorexidina, Competência bacteriana, *Streptococcus mutans*

Autora: Luiza Bittencourt de Borba, FOP-UNICAMP

Co-autores: Leonardo Libardi Pagotto, FOP-UNICAMP

Fernanda Cristina Petersen, Universidade de Oslo

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho, FOP – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Antimicrobianos são fatores de estresse que podem alterar a expressão de genes relacionados à competência bacteriana, isto é, um estado fisiológico que permite a captação de DNA exógeno (Blokesh, 2016). A competência permite que as bactérias adquiram novas características, como resistência a antibióticos.

Streptococcus mutans é um microrganismo capaz realizar transformação genética naturalmente (Morrison et al., 2015), através de um mecanismo conhecido de ativação da competência bacteriana (Ricomini Filho et al., 2019). A maquinaria necessária para ativar o estado de competência depende da expressão do fator sigma *sigX*, que pode ser induzido pelo peptídeo estimulador de competência - CSP (Håvarstein et al., 1997; Mashburn-Warren et al., 2010; Khan et al., 2012).

Ademais, o estado metabólico bacteriano está ligado à expressão do gene da lactato desidrogenase (*ldh*), crucial na produção de ATP. Analisar a expressão de *ldh* revela a viabilidade e estado metabólico de *S. mutans* diante da presença de antimicrobianos.

A clorexidina, antimicrobiano amplamente utilizado para controle do biofilme oral, é tradicionalmente aplicada em enxaguantes a 0,12% por até duas semanas. Recentemente, concentrações menores (0,06%) têm sido usadas por até seis meses, o que pode ativar a competência bacteriana e alterar a viabilidade das bactérias. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da exposição contínua à clorexidina (CHX) por 7 dias na

competência (por meio da expressão do gene *SigX*) e viabilidade (por meio da expressão do gene *ldh*) de cepas de *S. mutans*.

METODOLOGIA:

Este estudo foi realizado em duas etapas: a primeira definiu concentrações bacteriostática e bactericida de CHX em *S. mutans*; a segunda avaliou a expressão dos genes *sigX* e *ldh* usando repórteres de luciferase acoplados às regiões promotoras dos genes alvo. A pesquisa foi feita em colaboração internacional com a Profa. Fernanda Petersen (University of Oslo). A primeira etapa ocorreu no laboratório da FOP-UNICAMP, e a segunda na UiO, durante o estágio científico da aluna Luiza Bittencourt de Borba (jan-fev/2025).

Foram usados dois mutantes isogênicos da cepa UA159 de *S. mutans*: SM068, com repórter de luciferase no promotor de *sigX* (Khan et al., 2012), e SM120, com repórter no promotor de *ldh* (Dornelas-Figueira et al., 2023). As culturas foram preparadas em Tryptic Soy Broth (TSB), congeladas, diluídas e expostas por 7 dias a concentrações de CHX de 0 a 2,857 µg/mL em placas de 96 poços.

Os experimentos foram realizados em blocos de 7 dias: no dia 0, 100 µL das culturas congeladas (OD₆₀₀ 0,5) foram inoculados em 5 mL de TSB e incubados overnight a 37°C e 5% CO₂. No dia 1, 4 µL dessas culturas foram adicionados a cada poço em uma placa de 96 poços, conforme o layout experimental:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TSB (blank)	TSB (blank)										
B	2.857	2.4	2.0	1.8	1.667	1.489	1.304	0.909	0.476	0	0	
C	2.857	2.4	2.0	1.8	1.667	1.489	1.304	0.909	0.476	0	0	
D	2.857	2.4	2.0	1.8	1.667	1.489	1.304	0.909	0.476	0	0	
E	2.857	2.4	2.0	1.8	1.667	1.489	1.304	0.909	0.476	0	0	
F	2.857	2.4	2.0	1.8	1.667	1.489	1.304	0.909	0.476	0	0	
G	2.857	2.4	2.0	1.8	1.667	1.489	1.304	0.909	0.476	0	0	
H												

Figura 1. Layout da placa de 96 poços utilizada nos ensaios de avaliação da expressão gênica por luminescência nos dias 1-7. Cada poço contém 4 µL da cultura, 181 µL de TSB + CHX, 10 µL de luciferina (1 mM) e 5 µL de CSP ou água MilliQ (dependendo do grupo experimental). **A1–A2 (Controle TSB):** Meio TSB com luciferina (1 µM) e água MilliQ (controle negativo, sem bactéria). **B1–D11 (SM068 – *sigX*):** Mutante contendo repórter de

sigX; adição de CSP (10 µM). **E1–G11 (SM120 – *ldh*)**: Mutante contendo repórter de *ldh*; sem adição de CSP. **Colunas 1–11**: Gradiente decrescente de CHX (2,857 a 0 µg/mL).

As placas dos dias 1 a 7 foram incubadas a 37°C por 20 horas em um leitor de microplacas, com medições a cada 30 minutos do crescimento (OD₆₀₀) e expressão gênica por luminescência (RLU) de *sigX* ou *ldh*. Para manter a exposição contínua à CHX, a cada dia os 4 µL de cultura eram transferidos para a nova placa a partir do poço correspondente da placa anterior.

No 8º dia, após a pré-exposição à CHX, as culturas com crescimento nas maiores concentrações (1,4 e 1,6 µg/mL para *sigX*; 1,8 e 2,0 µg/mL para *ldh*) e o controle sem CHX (0 µg/mL) foram transferidas para novas placas para comparar o perfil de expressão gênica entre os grupos com e sem exposição prévia à CHX, uma vez que essa exposição fosse cessada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TSB	TSB										
B	0	0	0	0	0	0						

Figura 2. Layout da placa de 96 poços utilizada no experimento do 8º dia. **A1–A2 (Controle TSB)**: Meio TSB com luciferina (1 µM) e água MilliQ (controle negativo, sem bactéria). **B1–B2**: SM068 exposto a 0 CHX (experimento 1) ou SM120 exposto a 0 CHX (experimento 2). **B3–B4**: SM068 exposto 7 dias a 1.4 µg/mL CHX (experimento 1) ou SM120 exposto 7 dias a 2.0 µg/mL (experimento 2). **B5–B6**: SM068 exposto 7 dias a 1.6 µg/mL CHX (experimento 1) ou SM120 exposto 7 dias a 1.8 µg/mL CHX (experimento 2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os dados de RLU foram normalizados pelos valores de OD₆₀₀, e a área sob a curva (AUC) foi calculada. Os dados de AUC foram analisados por ANOVA de uma via e teste de Tukey (α=5%). Ambas as cepas de *S. mutans*, SM068 e SM120, previamente expostas à clorexidina, tenderam a apresentar crescimento bacteriano facilitado em comparação com as cepas não expostas (Figuras 1 e 2).

A expressão de *sigX* (AUC) foi aumentada com o aumento das concentrações de CHX, com valores de 23.147 ± 1.616, 90.784 ± 2.085 e 124.552 ± 1.872 RLU/OD₆₀₀ x h nas concentrações de 0, 1,4 e 1,6 µg/mL, respectivamente (Figura 3).

A expressão de *ldh* (AUC) aumentou quando exposta a 1,8 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de CHX, com valores de 756.544 ± 97.130 e 792.332 ± 69.170 RLU/OD₆₀₀ x h, respectivamente, em comparação com a ausência de exposição, cujo valor foi de 600.171 ± 17.514 RLU/OD₆₀₀ x h (Figura 4).

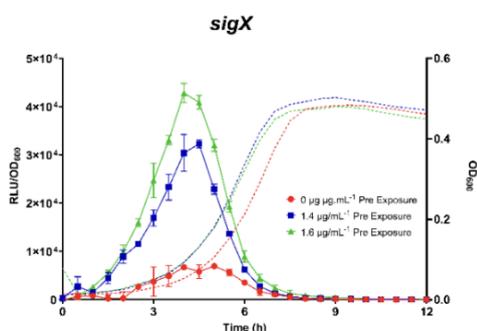


Figura 1. Expressão de *sigX* (RLU/OD₆₀₀; linha contínua) e crescimento bacteriano (OD₆₀₀; linha tracejada) da cepa SM068, previamente exposta por 7 dias a concentrações de CHX de 0, 1,4 ou 1,6 $\mu\text{g/mL}$.

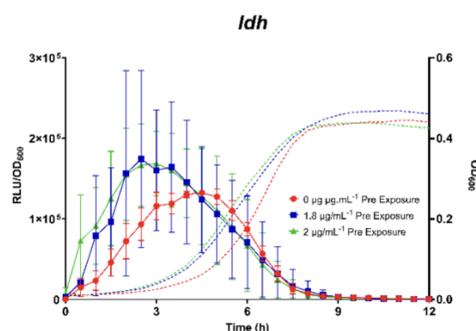


Figura 2. Expressão de *ldh* (RLU/OD₆₀₀; linha contínua) e crescimento bacteriano (OD₆₀₀; linha tracejada) da cepa SM120, previamente exposta por 7 dias a concentrações de CHX de 0, 1,8 ou 2,0 $\mu\text{g/mL}$.

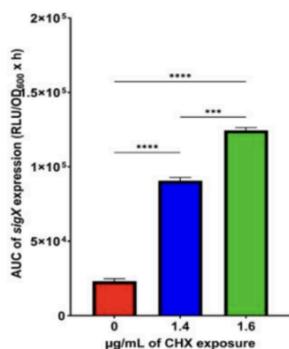


Figura 3. Área sob a curva da expressão de *sigX* (RLU/OD₆₀₀; linha contínua) ao longo do tempo da cepa SM068, previamente exposta por 7 dias a concentrações de CHX de 0, 1,4 ou 1,6 $\mu\text{g/mL}$. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

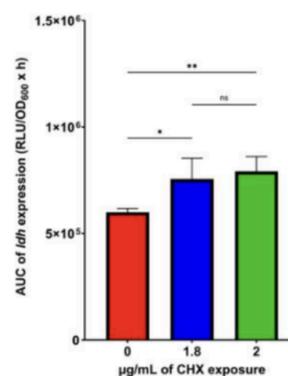


Figura 4. Área sob a curva da expressão de *ldh* (RLU/OD₆₀₀; linha contínua) ao longo do tempo da cepa SM120, previamente exposta por 7 dias a concentrações de CHX de 0, 1,8 ou 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

CONCLUSÕES:

Os resultados demonstraram que a exposição contínua à CHX por 7 dias pode aumentar a expressão do gene relacionado à competência em *S. mutans* (*sigX*), potencialmente favorecendo a aquisição de DNA extracelular, além de induzir a expressão do gene *ldh*, associado ao metabolismo, aumentando sua capacidade de virulência.

BIBLIOGRAFIA

1. Blokesch M. Natural competence for transformation. *Curr Biol*. 2016;26(21):R1126-R1130.
2. Dornelas-Figueira LM, Ricomini Filho AP, Junges R, Åmdal HA, Cury AADB, Petersen FC. In vitro impact of fluconazole on oral microbial communities, bacterial growth, and biofilm formation. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Sep 11;12(9):1433.
3. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*. 1997;15:55-62.
4. Håvarstein LS, Hakenbeck R, Gaustad P. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol*. 1997;179(21):6589-6594.
5. Morrison DA, Khan R, Junges R, Åmdal HA, Petersen FC. Genome editing by natural genetic transformation in *Streptococcus mutans*. *J Microbiol Methods*. 2015;119:134-141.
6. Khan R, Rukke HV, Ricomini Filho AP, Fimland G, Arntzen MØ, Thiede B, Petersen FC. Extracellular identification of a processed type II ComR/ComS pheromone of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2012;194(15):3781-3788.
7. Ricomini Filho AP, Khan R, Åmdal HA, Petersen FC. Conserved pheromone production, response and degradation by *Streptococcus mutans*. *Front Microbiol*. 2019;10:2140.
8. Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. Can chemical mouthwash agents achieve plaque/gingivitis control? *Dent Clin North Am*. 2015;59(4):799-829.
9. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial resistance (AMR). *Br J Biomed Sci*. 2023;80:11387.