



## Expressão de genes associados ao metabolismo da parede celular e de glucanos de *Streptococcus mutans*

**Palavras-Chave:** *Streptococcus mutans*, microbiologia, expressão gênica

**Autores(as):**

Fernanda Soares Andrade, FOP - UNICAMP

Emílio Alberto Ponce Fuentes, FOP - UNICAMP

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marlise Inêz Klein (orientadora), FOP - UNICAMP

---

### INTRODUÇÃO:

A cárie dental, é uma doença biofilme-açúcar-dependente, que resulta na desmineralização dos tecidos dentais, e, quando não controlado, pode levar a perda do elemento dental, gerando consequências para a saúde oral e sistêmica da população. A bactéria *Streptococcus mutans* está presente em grande quantidade na cavidade oral, e é o principal microorganismo associado à doença cárie. Quando ocorre a ingestão de sacarose na dieta, esse carboidrato atua como substrato para produção de ácidos e de substâncias poliméricas extracelulares (SPEs), especialmente glucanos, que atuarão na proteção das bactérias e auxiliarão no processo de adesão a superfície dentária. Além disso, sua virulência, também, está intimamente relacionada à produção de DNA (eDNA) e ácidos lipoteicóicos (LTA) extracelulares que interagem com SPEs nos biofilmes formados por *S. mutans*.

Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a expressão de genes associados ao metabolismo da parede celular e produção de glucanos, em cepas com deleção de genes associados à remodelagem da membrana citoplasmática (*lyT*, *lytS*), parede celular (*dltA*, *dltD*) e de síntese de glucanos (*gtfB*, *gtfC*, *gtfBC*), utilizando a cepa parental *UA159* como controle.

### METODOLOGIA:

#### **Cultivo das cepas**

As cepas, previamente congeladas a  $-75^{\circ}\text{C}$ , foram reativadas utilizando a técnica de semeadura por esgotamento em placas de Petri com ágar, e levadas para estufa ( $37^{\circ}\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$ , 48h). Após, foi feito o preparo do pré-inóculo, em que cerca de 5 a 8 colônias foram transferidas para um tubo Falcon, contendo 10 mL do meio de triptona e extrato de levedura

(TY), contendo glicose a 1% (37°C, 10% CO<sub>2</sub>, 16h). Esse processo foi feito para todas as cepas, totalizando 8 tubos. Essas culturas foram diluídas 1:20 em meio TY + 1% glicose para obtenção do inóculo, portanto, 0,5 mL do pré-inóculo foi adicionado a 9,5 mL do meio preparado; nessa etapa, foram feitos 2 tubos para cada uma das cepas, totalizando 16 tubos Falcon. Foi realizada a leitura da densidade óptica para cada tubo, sendo considerado o tempo 0h. Todos os inóculos foram levados para incubadora (37°C, 10% CO<sub>2</sub>, 2 a 5h - houve variação no tempo de crescimento de acordo com a cepa), até alcançar a fase de crescimento logarítmico, quando a densidade óptica alcançou cerca de 0,2 (D.O.<sub>.550nm</sub>). Ao alcançar esse valor, um volume de 6,625 mL foi transferido para um novo tubo contendo 0,375 mL de glicose ou sacarose a 20%, fazendo com que a concentração final de cada carboidrato ficasse a 1%, sendo considerado um “pulso” de carboidratos. Foi novamente levado para incubação por 4 horas (37°C, 10% CO<sub>2</sub>). Quando removidas, foi feita nova leitura da D.O.<sub>.550nm</sub>.

Posteriormente, foi feita centrifugação (5,000 xg, 10 min, 4°C), para separação do líquido sobrenadante e do precipitado. O precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de RNAlater.

#### ***Análise de expressão gênica via RT-qPCR:***

A extração de RNA foi realizada utilizando o método fenol:clorofórmio (Cury & Koo, 2007). Ao fim da extração, foi realizada a quantificação do RNA total “bruto”, utilizando o nanoespectrofotômetro.

Após, foi dado início ao processo de purificação desse RNA “bruto”, iniciando com o tratamento com DNase na coluna, utilizando o Qiagen RNeasy Micro Kit, seguindo as instruções do fabricante; ao fim do protocolo, foi realizada nova leitura para quantificação do RNA parcialmente purificado, utilizando o nanoespectrofotômetro. A próxima etapa da purificação foi realizada com o tratamento com DNase em solução, utilizando o Ambion Turbo DNase Kit (37°C, 30 min.); foi realizada nova quantificação. A última etapa desse processo, foi a limpeza final com o Qiagen RNeasy MinElute Cleanup Kit, seguindo as instruções do fabricante, sendo que ao fim desse processo, foi feita nova quantificação do RNA total purificado, além do gel de agarose a 1%, para avaliar a integridade das amostras obtidas.

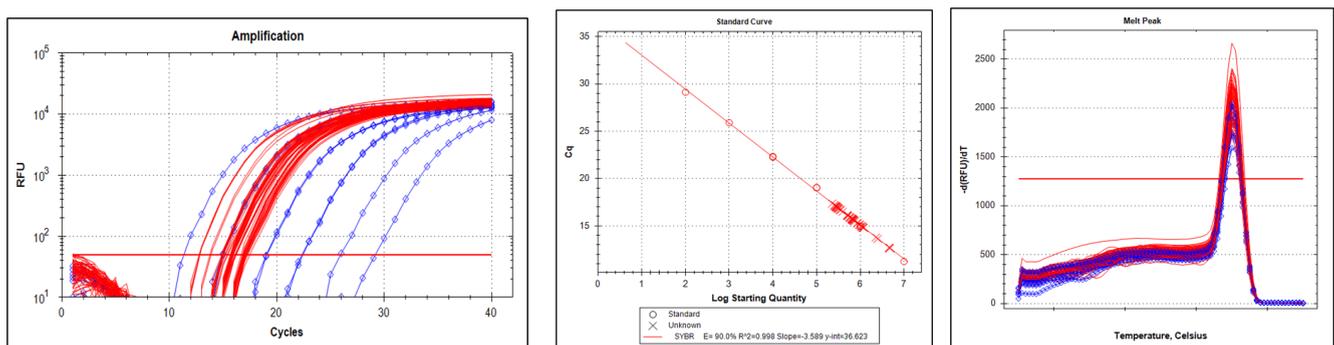
Em seguida, foi feita a síntese de cDNA, com o iScript DNA Synthesis Kit. Para isso, foi preparado o Master Mix sendo um kit para +RT (contendo a enzima transcriptase reversa), e outro, para -RT (sem a enzima). As amostras foram incubadas no equipamento de PCR até o fim do ciclo. As amostras de cDNA +RT foram diluídas 1:5 (misturando 10 µL de cDNA + 40

$\mu\text{L}$  de água molecular) para os genes alvo específicos e 1:1000 (misturando 5  $\mu\text{L}$  de cDNA diluído 1:5 + 995  $\mu\text{L}$  de água de grau molecular) para o gene normalizador (*16s rRNA*).

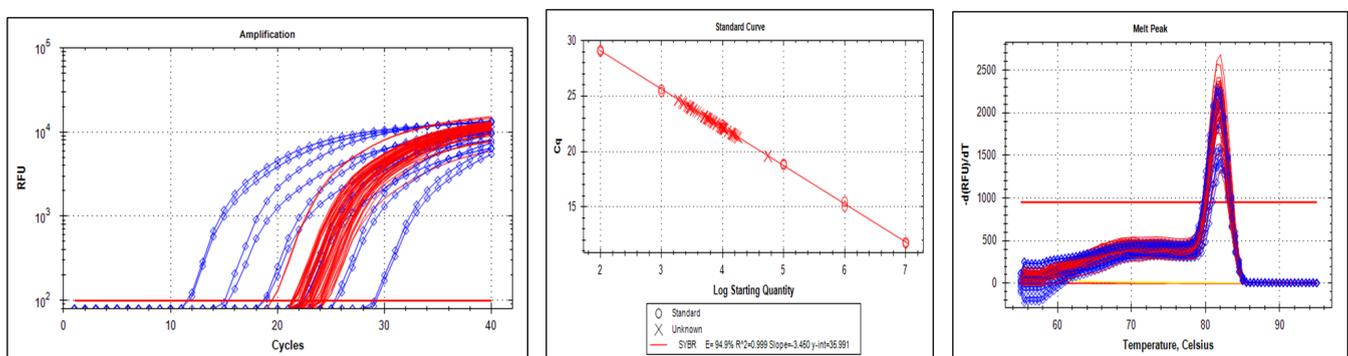
Após, foi feita a diluição dos primers, seguindo as orientações do fabricante, e também a quantificação no nanoespectrofotômetro, para avaliar se a concentração está próxima da estimada. Os primers foram testados em PCR convencional e foi verificado se estavam adequados em gel de agarose.

Após garantir que os primers estavam apropriados, foi dado início as reações quantitativas de PCR, onde foram avaliados 2 genes específicos (*gtfB* e *murA*) e o gene normalizador *16s rRNA*. Para isso, foi utilizada uma placa de 96 poços, para cada um dos genes, contendo os 6 pontos da curva padrão, o *non template control* (NTC) e os genes +RT específicos. Os resultados das corridas estão demonstrados abaixo:

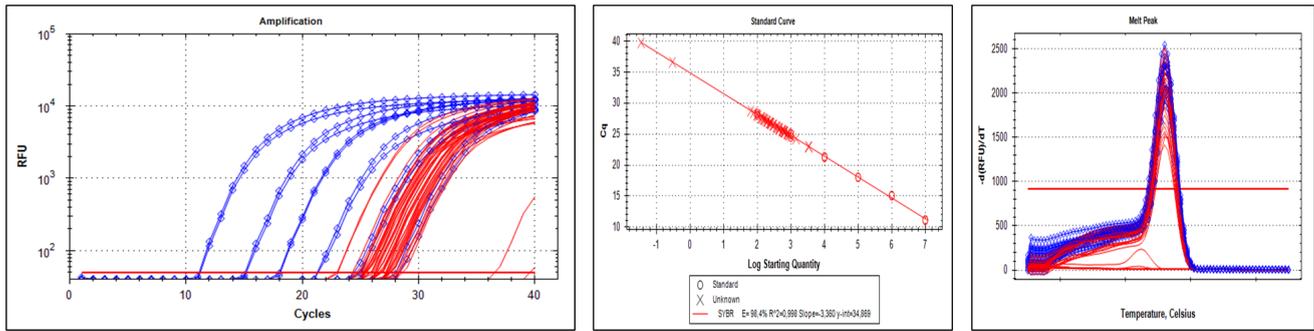
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:



**Figura 1.** Gráficos de amplificação (Amplification), de curva padrão (standard curve; com 6 pontos) e de dissociação (melt peak) de corrida de qPCR com primer para o gene *16S rRNA* de *S. mutans*. Os parâmetros de eficiência de reação, de inclinação da reta (slope) e de correlação estão adequados, e, portanto, os dados obtidos para as amostras de cDNA também estão adequados. Os dados na cor vermelha representam as amostras e os dados na cor azul representam os pontos da curva padrão.

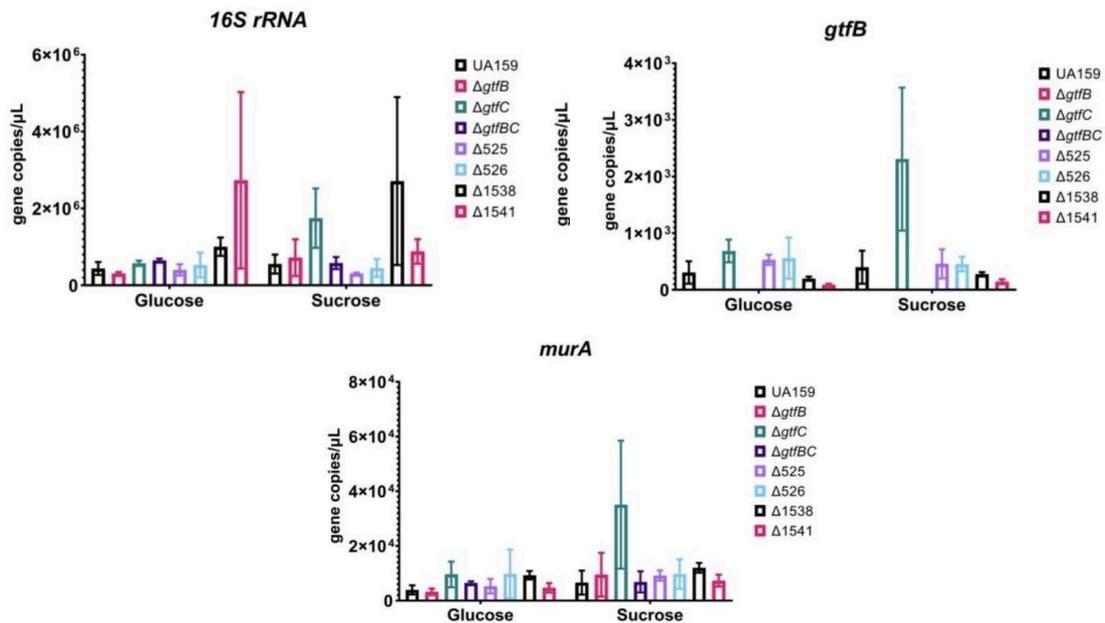


**Figura 2:** Gráficos de amplificação (Amplification), de curva padrão (standard curve; com 6 pontos) e de dissociação (melt peak) de corrida de qPCR com primer para o gene *murA* de *S. mutans*. Os parâmetros de eficiência de reação, de inclinação da reta e de correlação estão adequados, e, portanto, os dados obtidos para as amostras de cDNA também estão adequados. Os dados na cor vermelha representam as amostras e os dados na cor azul representam os pontos da curva padrão.



**Figura 3:** Gráficos de amplificação (Amplification), de curva padrão (standard curve; com 6 pontos) e de dissociação (melt peak) de corrida de qPCR com primer para o gene *gtfB* de *S. mutans*. Os parâmetros de eficiência de reação, de inclinação da reta e de correlação estão adequados, e, portanto, os dados obtidos para as amostras de cDNA também estão adequados. Os dados na cor vermelha representam as amostras e os dados na cor azul representam os pontos da curva padrão.

Os dados das corridas foram tabulados e analisados, como consta na **Figura 4**



**Figura 4. Dados de expressão gênica.** Estão representados nos gráficos os dados para cada gene (média e desvio padrão).

## CONCLUSÕES:

Observa-se nos gráficos que, para o gene normalizador *16s rRNA*, houve maior expressão do gene nas cepas  $\Delta dltA$  - glicose e  $\Delta dltD$  - sacarose, além da cepa  $\Delta gtfC$  - sacarose. Já em relação aos genes *gtfB* e *murA*, em ambos nota-se maior expressão dos genes na cepa  $\Delta gtfC$  - sacarose.

Portanto, a cepa *ΔgtfC* com o pulso de sacarose foi a que mais expressou os três genes supracitados, porém, não foi possível identificar o motivo disso e serão necessárias mais análises para elucidar esse comportamento da bactéria.

Comitê de ética: CIBIO-FOP nº 01/2022.

## BIBLIOGRAFIA

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR, Klein MI. **Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms.** Biofouling. 2017 Oct;33(9):722-740. doi: 10.1080/08927014.2017.1361412.

Cury JA, Koo H. **Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms.** Anal Biochem. 2007; 365 (2):208-14. DOI: 10.1016/j.ab.2007.03.021.

Feng G, Klein MI, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H. **The specific degree-of-polymerization of A-type proanthocyanidin oligomers impacts *Streptococcus mutans* glucan-mediated adhesion and transcriptome responses within biofilms.** Biofouling. 2013;29(6):629-40. doi: 10.1080/08927014.2013.794456.

Florez Salamanca EJ, Dantas RM, Rodriguez MJ, Klein MI. **Establishment of microcosm biofilm models that reproduce a cariogenic diet intake.** Biofouling. 2020 Nov;36(10):1196-1209. doi: 10.1080/08927014.2020.1862093.

Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Koo H. ***Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics.** PLoS One. 2012;7(9):e45795. doi: 10.1371/journal.pone.0045795.

Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Heydorn A, Koo H. **The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm.** PLoS Pathog. 2012;8(4):e1002623. doi: 10.1371/journal.ppat.1002623.

Yin JL, Shackel NA, Zekry A, et al. **Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I.** Immunol Cell Biol. 2001; 79:213-221. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2001.01002.x.