

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Heitor Sales de Barros Santos

Análise do transcriptoma de genes responsáveis pela tolerância ácida em
Streptococcus mutans presentes em superfícies radiculares hígidas e com lesão de cárie

Porto Alegre

2019

Heitor Sales de Barros Santos

Análise do transcriptoma de genes responsáveis pela tolerância ácida em
Streptococcus mutans presentes em superfícies radiculares hígidas e com lesão de cárie

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Cariologia e Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

Co-orientadora: Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Faturi Parolo

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

À minha *família*, meu infinito agradecimento pela vida, pelo amor incondicional e pela educação. Obrigado por sempre estarem presentes em todos os momentos e pelos esforços que fazem para que todos meus sonhos se tornem realidade. Sem o incentivo de vocês com certeza eu não teria chegado até aqui. Todas minhas conquistas são fruto de toda a dedicação e carinho que recebi de vocês durante toda a minha vida. São minha grande inspiração e, tudo que eu faço, é com o objetivo de orgulha-los. Obrigado mais uma vez. Amo vocês!

Aos meus orientadores, *Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur e Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Faturi Parolo*, por todo o incentivo, paciência, dedicação, competência, comprometimento, palavras positivas e por acreditarem no meu potencial. Obrigado pelos valiosos ensinamentos e conselhos que me fizeram aprender sempre mais. Vocês são minha inspiração.

Aos meus amigos de mestrado e laboratório, *Débora Grando, Maria Eduarda, Guilherme Porto Alegre, Douglas Delevati, Ariel Rup e Luisa Mercado*, por estarem comigo durante esses quase dois anos de caminhada. Obrigado pelos ensinamentos diários, conselhos, risadas, troca de experiências, convívio excepcional e dificuldades compartilhadas e vencidas juntos. Tudo teria sido mais difícil e demorado (até impossível) sem vocês! Amo muito cada um!

Aos professores da pós-graduação, em especial da *Cariologia/Dentística*, obrigado pelos valiosos ensinamentos e experiências trocadas.

Por fim, agradeço a todos que estiveram comigo durante toda a minha caminhada e, que direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui. OBRIGADO!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SANTOS, Heitor Sales de Barros. **Análise do transcriptoma de genes responsáveis pela tolerância ácida em *Streptococcus mutans* presentes em superfícies radiculares hígidas e com lesão de cárie.** Dissertação em Odontologia, Nível Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

RESUMO

Nas últimas décadas inúmeros estudos estão sendo realizados para melhor entendimento sobre os principais microrganismos envolvidos na etiopatogenia da cárie radicular. Uma atenção é dada ao *Streptococcus mutans*, pelo fato deste microrganismo ser isolado de biofilmes associado a lesões de cárie com bastante frequência e apresenta características imprescindíveis para desenvolvimento da doença, como a capacidade de produção de ácidos (acidogenicidade) e de tolerância a ambientes ácidos (aciduricidade). Evidências acerca dos mecanismos de tolerância ácida utilizados pelos *S. mutans* foram obtidas a partir de estudos *in vitro* nos quais essas bactérias foram analisadas isoladamente e sob condições experimentais laboratoriais. Considerando a complexidade microbiana dos biofilmes dentais e potenciais interações microbianas que ocorrem nesse ambiente microbiologicamente diverso, torna-se necessário analisar quais os mecanismos de tolerância ácida estão sendo expressos em biofilme polimicrobiano obtidos de amostras clínicas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância ácida de *S. mutans* através da análise de transcriptoma de biofilmes naturais de superfícies radiculares hígidas (n=10, SRS) e de biofilme e dentina radicular ativa (n=9, RC). O RNA total microbiano foi extraído e o mRNA isolado e sequenciado na plataforma Illumina Hi-Seq2500. Foram formados *pool* (grupamentos) das amostras com valores inferiores a 30ng/RNA para a construção de bibliotecas genômicas. Os dados gerados pelo sequenciamento de RNA-Seq foram compilados em uma tabela de contagem (*reads*) e mapeados com o genoma de referência (*S. mutans* UA159). Para o cálculo do nível de expressão gênica os dados foram normalizados com o algoritmo DESeq. Os genes que apresentaram expressão diferencial em superfícies radiculares cariadas foram analisados para uma melhor compreensão da sua importância para adaptação de *S. mutans* a um ambiente ácido. 69 genes apresentaram expressão diferencial em RC, e nenhum gene apresentou expressão diferencial SRS. Os principais mecanismos que apresentaram expressão diferencial relacionados com a tolerância de *S. mutans* ao ambiente ácido foram: genes associados ao metabolismo e transporte de açúcares, metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos, biossíntese de

aminoácidos, atividade de membrana plasmática, genes relacionados à comunicação celular e resposta á fatores externos, genes relacionados ao controle do pH extracelular e genes relacionados à mecanismos de reparos á macromoléculas. Estes resultados elucidam os principais genes responsáveis pela tolerância ácida de *S. mutans* em amostras clinicas.

Palavras-chave: RNA-seq; *Streptococcus mutans*; Cárie Radicular; Transcriptoma; Expressão gênica.

SANTOS, Heitor Sales de Barros. **Transcriptome analysis of genes responsible for acid tolerance in *Streptococcus mutans* present on sound root surfaces and with carious lesions.** Dissertation in Dentistry, Master Degree – Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

ABSTRACT

In the last decades countless studies are being carried out to better understand the main microorganisms involved in the etiopathogenesis of root caries. Attention is given to *Streptococcus mutans*, since microorganism is isolated from biofilms associated with caries lesions quite frequently and presents essential characteristics for the development of the disease, such as acid production capacity (acidogenicity) and tolerance to acid environments (aciduricity). Evidence about the acid tolerance mechanisms used by *S. mutans* was obtained from in vitro studies in which these bacteria were analyzed separately and under experimental laboratory conditions. Considering the microbial complexity of dental biofilms and potential microbial interactions that occur in this microbiologically diverse environment, it is necessary to analyze which mechanisms of acid tolerance are being expressed in polymicrobial biofilm obtained from clinical samples. Thus, the objective of this work was to evaluate the differential expression of genes involved in the mechanisms of acid tolerance of *S. mutans* by transcriptome analysis of natural biofilms of sound root surfaces (n = 10, SRS) and biofilm and root dentin active (n = 9, RC). Total microbial RNA was extracted and mRNA isolated and sequenced on the Illumina Hi-Seq2500 platform. Pooling of samples with values below 30ng / RNA was formed for the construction of genomic libraries. Data generated by RNA-Seq sequencing was compiled into a table of reads (reads) and mapped to the reference genome (*S. mutans* UA159). For the calculation of gene expression level the data were normalized with the DESeq algorithm. Genes that showed differential expression on decayed root surfaces were analyzed for a better understanding of their importance for adaptation of *S. mutans* to an acidic environment. 69 genes showed differential expression in CR, and no gene showed differential expression SRS. The main mechanisms that showed differential expression related to *S. mutans* tolerance to the acid environment were: genes associated with sugar metabolism and transport, nucleotide and nucleoside metabolism, amino acid biosynthesis, plasma membrane activity, genes related to cellular communication and response to external factors, genes related to extracellular pH control and genes related to macromolecule repair mechanisms. These

results elucidate the main genes responsible for acid tolerance of *S. mutans* in clinical samples.

Key-words: RNA-seq; *Streptococcus mutans*; Root Caries; Transcriptome; Gene Expression.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Ecologia da Cavidade Bucal e Microbiologia associada á Cárie dental	4
1.2	Mecanismos de tolerância ácida	7
2	OBJETIVO	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
4	RESULTADOS	16
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	48
7	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Cárie dentária é uma doença resultante de alterações físico-químicas no equilíbrio dinâmico entre dente e fluidos orais que são induzidas por ácidos oriundos do metabolismo de bactérias do biofilme dental (Wade, 2013). Sabe-se que muitas variáveis podem modular esse equilíbrio físico-químico, como a composição salivar de cada indivíduo (proteínas, enzimas, cálcio, fosfato, flúor), fatores genéticos, exposição inadequada à fluoretos, fatores socioeconômicos, psicológicos, ambientais e estilo de vida. Porém a presença de um biofilme acumulado sobre as superfícies dentais e uma dieta caracterizada por uma frequente ingestão de carboidratos fermentáveis (principalmente açúcares) são sempre necessários para que o desenvolvimento da doença ocorra (García-Godoy & Hicks, 2008), (Christensen *et al.*, 2015), (Sheiham & James, 2015), (Pitts *et al.*, 2017).

A cavidade oral é colonizada por diversos microrganismos, sendo constituída por mais de 1.000 espécies de microrganismos. Alguns desses microrganismos apresentam capacidade de produzir ácido como produto final da metabolização de carboidratos oriundos da dieta, levando assim à uma diminuição do pH do biofilme. É nessa condição que o equilíbrio físico-químico entre o mineral do dente e o fluido do biofilme e a saliva é rompido, resultando assim na dissolução do conteúdo mineral dos tecidos dentais e o consequente surgimento de lesões de cariosas (Wade, 2013), (Tan *et al.*, 2017), (Cavazana *et al.*, 2018). Quanto mais frequentes forem esses eventos de queda de pH, mais minerais serão perdidos (García-Godoy & Hicks, 2008), (Wade, 2013), (Pitts *et al.*, 2017). Ao longo do tempo, sempre que esses eventos de desmineralização forem mais intensos e mais frequentes e superarem a capacidade remineralizadora natural da saliva, a lesão cariosa progride (Takahashi & Nyvad, 2016), (Pitts *et al.*, 2017). Este processo de desmineralização se não for controlado pode levar à um aumento da porosidade do esmalte e à ampliação dos espaços inter cristalinos, comprometendo a integridade estrutural da superfície do esmalte, que pode se romper levando ao surgimento de uma cavidade de cárie (Pitts *et al.*, 2017).

Cárie dentária não tratada em dentes permanentes aparece como a doença mais prevalente em todo mundo sendo que aproximadamente 35% da população (cerca de 2,4 bilhões de pessoas) foram afetadas por essa doença no ano de 2010 (Frencken *et al.*, 2017). No Brasil, dados oriundos da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (2010) (Brasil, 2012) utilizando o índice CPO que é composto por dentes cariados, perdidos ou obturados

(restaurados) em decorrência de lesões cárias, demonstraram como resultado que crianças de 12 anos e adolescentes de 15 a 19 anos apresentavam respectivamente em torno de 2,07 e 4,25 dentes com experiência de cárie (dentes cariados, perdidos por cárie ou obturados) na dentição permanente; adultos de 35 a 44 anos e idosos de 65 a 74 anos apresentaram cerca de 16,75 e 27,53 dentes com experiência de cárie, respectivamente. Destaca-se o fato, de que o componente perdido é responsável por cerca de 44,7% do índice no grupo de 35 a 44 anos e 92% no grupo de 65 a 74 anos.

Nesse contexto, é importante mencionar que com o aumento da expectativa de vida da população e com uma redução no edentulismo em todas as idades, observa-se um aumento na prevalência de cárie radicular, estimando-se que 41,5% da população mundial é acometida por essa doença (Beck, 1990), (Tan *et al.*, 2017), (Pentapati *et al.*, 2019). Cárie radicular pode ser definida como uma cárie que acomete a porção radicular do dente quando essa superfície radicular está exposta devido ocorrência de recessão gengival (RG), que por sua vez, pode ocorrer tanto devido a um fator fisiológico (o próprio envelhecimento, por exemplo) ou a um fator patológico (como consequência de doença periodontal) (Ritter *et al.*, 2010), (Tan *et al.*, 2017). Além disso, alguns fatores de risco estão relacionados com RG, como: idade avançada, tabagismo, menor frequência de escovação dentária, presença de cálculo dentário e trauma mecânico gengival em decorrência de escovação dental traumática (Rios *et al.*, 2014). A prevalência de recessão gengival reportada no mundo ($RG \geq 1$ mm) é bastante variada, (de 58% a 84,6%) (Serrano *et al.*, 2018). No Brasil há relatos de que $RG \geq 1$ mm pode afetar até 99,7% dos indivíduos (Rios *et al.*, 2014).

Havendo recessão gengival, cemento e dentina tornam-se expostos na cavidade bucal. Esses tecidos são menos mineralizados quando comparados ao esmalte, apresentando aproximadamente 70% do seu conteúdo total composto por minerais, enquanto que o esmalte dental possui uma composição quase que predominantemente mineral (Takahashi *et al.*, 2016). Esta diferença na composição tem como consequência uma desmineralização aproximadamente duas vezes mais rápida na superfície radicular do que no esmalte, pois além da desmineralização do conteúdo mineral, ocorre também a degradação do colágeno, que faz parte do material orgânico presente na dentina (Tan *et al.*, 2017). Além disso o pH necessário para desmineralizar o esmalte e a dentina (chamado de pH crítico) são diferentes ($pH < 5,5$ para esmalte e pH de 6,0 a 6,9 para dentina), o que permite que as perdas de minerais da dentina sejam mais rápidas já que o

pH crítico para desmineralização desse tecido é mais frequentemente atingido. (Dawes, 2003), (Wierichs & Meyer-Lueckel, 2014), (Delgado & Olafsson, 2017). O fato da dentina possuir mais carbonato e magnésio em sua composição mineral quando comparado ao esmalte dental, e por possuir uma estrutura tubular, contribui para que as perdas minerais em dentina sejam mais rápidas (Takahashi *et al.*, 2016).

Além dos fatores descritos acima, outros podem estar associados ao surgimento de lesões cariosas radiculares. Um deles é o uso de próteses que apresentam contato direto com superfícies radiculares, estas propiciam um maior acúmulo de biofilme e conseqüentemente esta região apresenta um maior risco para o desenvolvimento de cárie radicular (Tan & Lo, 2014). Cárie coronária e alto nível de acúmulo de biofilme dental são marcadores de risco tradicionais e são fatores de que devem ser considerados para desenvolvimento de cárie radicular, assim como grande quantidade de superfícies radiculares expostas que apresentam potencial para desenvolvimento de lesões (Ritter *et al.*, 2010), (Hayes *et al.*, 2016). Outros fatores que devem ser levados em conta é a alta ingestão de carboidratos, baixo fluxo salivar, baixa exposição ao flúor, baixo nível sociocômico e visitas infrequentes ao dentista parecem estar associados à ocorrência de cárie em superfície radicular (Youngs, 1994), (Christensen *et al.*, 2015), (Pentapati *et al.*, 2019).

Da forma semelhante ao descrito acima, há uma grande variabilidade na prevalência de cárie radicular ao redor do mundo. Uma pesquisa realizada na Alemanha apresenta como resultado que do ano de 1997 para o ano de 2006, a prevalência de lesões de cárie radicular passou 15,5% para 45% (Wierichs & Meyer-Lueckel, 2014). Na Dinamarca a prevalência de cárie radicular ativa reportada foi de apenas 4%, enquanto as superfícies radiculares restauradas apresentaram prevalência de 26% (Christensen *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos a prevalência de cárie radicular foi de aproximadamente 20% (Chi *et al.*, 2013). Na Austrália a prevalência de cárie radicular em idosos institucionalizados reportada foi de 77,4% (Silva *et al.*, 2014). No que diz respeito a cárie radicular no Brasil, sua prevalência foi 16,7% em adultos (variando entre 6,0% em Porto Alegre e 28,5% em São Luís) e 13,6% em idosos (variando entre 4,8% na capital Rio de Janeiro e 26,7% em Belém) (Marques *et al.*, 2013). Um estudo de coorte realizado em Porto Alegre entre os anos de 2011/2012 e 2016/2017 obteve como resultado que a incidência de cárie radicular na amostra estudada composta por adultos e idosos foi de 35,7% (Izquierdo, 2018). Além disso, dados do SB Brasil 2010 (Brasil, 2012)

demonstram que para população nos grupos etários de 35 a 44 anos e de 65 a 74 anos apresentavam respectivamente, em média, índice de cárie radicular de 0,32 e 0,23 (esse índice é calculado considerando-se o número de raízes cariadas e obturadas divididos pelo número de raízes expostas). Estes valores baixos podem ser explicados pela grande perda dentária nessas faixas etárias.

A cavidade bucal é um ambiente com alta diversidade microbiana. Muitas vezes esses microrganismos estão em equilíbrio com o hospedeiro fazendo com que as superfícies dentais e tecidos estejam numa condição clínica saudável. Porém, determinados fatores ambientais podem atuar diretamente sobre essa microbiota, induzindo um desequilíbrio ecológico que pode resultar no desenvolvimento de doenças. Para entendermos de que forma esse desequilíbrio microbiológico está associado com a transição de uma condição de saúde para uma condição de doença, é necessário compreendermos a ecologia da cavidade bucal.

1.1 Ecologia da Cavidade Bucal e Microbiologia associada á Cárie dental

Diversos nichos da cavidade bucal podem ser colonizados por microrganismos, como as superfícies mucosas (tais como língua, bochecha, palatos duro e mole) e superfícies dentais, em especial a superfície oclusal em dentes em erupção, a região cervical e a superfície proximal abaixo do ponto de contato, pois estas regiões são relativamente protegidas do contato mecânico da língua, bochechas e da escovação (Kidd & Fejerskov, 2004), (Takahashi, 2005), (Deo & Deshmukh, 2019). É importante salientar que cada nicho irá apresentar características únicas que permitirá que os microrganismos mais adaptados colonizem aquela região (Takahashi, 2005).

Pelo fato da cavidade bucal ser um habitat dinâmico sujeito à rápidas mudanças ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes, mudanças nos níveis de oxigênio, flutuação rápida de pH, ou mesmo estresse osmótico, é comum ocorrer interações interbacterianas envolvendo mecanismos de cooperação (simbiose) como complementação enzimática e formação de cadeias alimentares no intuito de otimizar obtenção de energia para fins de manutenção da viabilidade celular. Além disso, transferência de genes ou comunicação intercelular permitem que as bactérias sintam as modificações ambientais e comuniquem-se entre si a fim de orquestrarem uma expressão gênica diferenciada e associada aos fatores ambientais. Porém, no biofilme também ocorrem competições (antibiose) entre os microrganismos, alguns mecanismos são a

produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas e produção de peróxido de hidrogênio, produção de ácidos orgânicos que modificam o pH do meio comprometendo a viabilidade de microrganismos ácido sensíveis, bem como a competição por nutrientes essenciais para sobrevivência microbiana (Lemos *et al.*, 2005), (Gong *et al.*, 2009), (Liu *et al.*, 2015), (Marsh *et al.*, 2017). Um perfeito equilíbrio entre simbiose e antibiose é necessário para que haja homeostasia microbiana na cavidade bucal e uma condição de harmonia entre microbiota e hospedeiro.

Alguns fatores, porém, podem alterar a homeostasia microbiana na cavidade bucal, como má higiene bucal, redução de fluxo salivar pelo uso de medicamentos ou radioterapia e alterações na dieta (um aumento no consumo de açúcares principalmente entre as refeições) (Marsh, 2003). A dieta aparece como um fator importante nas alterações do microbioma oral, pois ácidos orgânicos (principalmente ácido lático) oriundos do metabolismo de carboidratos da dieta pelas bactérias do biofilme dental causam flutuações no pH que perturbam a relação simbiótica entre o hospedeiro e o microbioma presente na cavidade bucal (Sheiham & James, 2015) (Pitts *et al.*, 2017). Tal modificação, dificulta o crescimento de bactérias benéficas (ácido sensíveis) e propicia o crescimento e seleção de bactérias com capacidade de produzir (acidogênicas) e de tolerar ambientes ácidos (acidúricas). Essa seleção e modificação microbiológica induzida por flutuações no pH que estão diretamente relacionadas à dieta e que resultam no aumento na proporção de bactérias potencialmente cariogênicas (acidogênicas e acidúricas) é conhecida como “Hipótese da placa ecológica” (Takahashi & Nyvad, 2008), (Takahashi & Nyvad, 2016), (Marsh, 2018).

Sendo assim, o microbioma da cavidade oral em saúde é composto por muitas espécies bacterianas, a superfície do esmalte saudável é colonizada principalmente por *Actinomyces* e *Streptococcus*, espécies como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis* representam cerca de 95% de todos os *Streptococcus* presentes no biofilme em saúde, enquanto *Streptococcus mutans* representa apenas 2% (Struzycka, 2014). Porém, outros gêneros também são encontrados em biofilme dental compatível com saúde, como *Veillonella*, *Granulicatella*, *Gamella*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Nisseria*, *Haemophilis*, *Treponema*, *Lactobacterium*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacteria*, and *Propionibacterium* (Zarco *et al.*, 2011).

Entretanto, em condições de doença o biofilme associado às lesões cariosas coronárias é composto por microrganismos que apresentam características de acidogenicidade e aciduricidade, ou seja, aqueles que foram selecionados em decorrência das frequentes quedas de pH, entre eles podemos citar: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Bifidobactérias* spp. e leveduras (Struzycka, 2014). Ainda neste contexto, os primeiros colonizadores das superfícies radiculares não diferem aos do esmalte, entre eles temos *Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp. (*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*) que são encontrados em abundância em um biofilme associado à saúde, porém o biofilme associado à lesões cariosas radiculares ativas sofre mudanças em decorrência ao ambiente ácido, logo, bactérias que apresentam uma maior capacidade de sobreviver em ambientes com baixo pH são selecionadas, entre elas: *Streptococcus mutans*, *Bifidobacterias* spp., *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus* spp. (Takahashi *et al.*, 2016), (Damé-Teixeira *et al.*, 2017), (Do *et al.*, 2017). É importante que o biofilme nas superfícies radiculares apresenta uma maior quantidade de proteínas oriundas do fluído crevicular, esta característica auxilia a colonização de espécies proteolíticas como *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter* e *Selenomonas* spp. (Do *et al.*, 2017).

Apesar de sabermos que a cárie dental é mediada por um biofilme polimicrobiano, o *S. mutans* ainda tem sido considerado como microrganismo-modelo do processo cariogênico por possuir características de virulência e mecanismos envolvidos com o desenvolvimento de um biofilme cariogênico. O *S. mutans* perfaz um terço da microbiota total de lesões cavitadas em dentina (Do *et al.*, 2017). A presença de *S. mutans* em grande quantidade em lesões de cárie ou mesmo em biofilmes associados à lesões cariosas deve-se ao fato dessas bactérias, além de serem acidogênicas e acidúricas, serem capazes de sintetizar polímeros extracelulares no biofilme dental, que são capazes de aumentar a porosidade desses biofilmes e torná-los mais aderidos á superfície dental. As alterações estruturais induzidas por esses polímeros na matriz do biofilme dental estão intimamente associadas ao potencial cariogênico desempenhado por esses biofilmes (Takahashi & Nyvad, 2008), (Bowen *et al.*, 2018).

Com o objetivo de verificar como alterações no pH em decorrência da metabolização de carboidratos afetam a composição microbiana, Bradshaw *et al.* (1989) desenvolveram um estudo utilizando 9 bactérias orais que num primeiro momento foram

cultivadas na presença de glicose em um pH constante (7,0) por todo período de 10 dias. Posteriormente, essas bactérias foram cultivadas numa condição em que o controle do pH era interrompido por seis horas após cada fornecimento de glicose, permitindo que o pH reduzisse. Os resultados obtidos demonstraram que quando as quedas no pH são evitadas, pouca modificação ocorre na composição microbiota, apenas as proporções de *Actinomyces viscosus* e *Veillonella dispar* aumentaram; *Lactobacillus casei* e *S. mutans* permaneceram em níveis baixos (0,2% e 1,0%, respectivamente), os produtos finais predominantes do metabolismo da cultura polimicrobiana foi acetato e o propionato. Porém, quando as quedas de pH foram permitidas, a composição da microbiota se modificou, havendo aumento na proporção de *Lactobacillus casei* e *S. mutans* aumentaram tanto na proporção da contagem total quanto em números absolutos, e *Veillonella dispar*, *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium nucleatum* e *Neisseria subflava* e *Streptococcus sanguis* foram consideravelmente reduzidos. O produto final predominante do metabolismo da cultura polimicrobiana lactato. Sendo assim, este estudo pode evidenciar que as frequentes quedas de pH modificam a composição microbiana e elucidam o potencial cariogênico tanto do *S. mutans* quanto do *L. casei*.

Ainda neste contexto, Horiuchi *et al.*, 2009 desenvolveram um estudo utilizando *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Lactobacillus paracasei* e *Actinomyces naeslundii* e tinham como objetivo investigar quais bactérias eram capazes de sobreviver a acidificações fisiológicas (como as que ocorrem em um biofilme cariogênico, pH±4). Obtiveram como resultado que os *S. mutans* e *L. paracasei* cresceram em pH 4,0, mas o crescimento de *S. sanguinis* e *S. oralis* foi interrompido quando pH ficou abaixo de 4,2 e entre 4,2 e 4,4, respectivamente. A acidificação do meio para um pH de 4,0 por 1 h reduziu a viabilidade de 43 a 89% de *S. sanguinis*, 45% de *S. oralis* e de 35 a 76% de *Actinomyces naeslundii*. A acidificação não prejudicou o crescimento de *S. mutans* nem de *L. paracasei*, o que mostra que a tolerância á ambientes ácidos é um importante característica desses microrganismos.

1.2 -Mecanismos de tolerância ácida

Logo após a ingestão de alimentos altamente açucarados, os níveis de açúcar na saliva e no biofilme podem aumentar em até 1000x, e a concentração de carboidratos na cavidade oral passa 10 µM para mais de 10 mM, causando uma diminuição dramática no pH do biofilme para valores ao redor de 4,0 ou até mesmo níveis abaixo de valor (Lemos *et al.*, 2005), (Gong *et al.*, 2009).

Para sobreviver em biofilmes dentais frequentemente acidificados, as bactérias devem possuir mecanismos para sentir, responder e se adaptar às condições de acidificação (Gong *et al.*, 2009), (Liu *et al.*, 2015). Muitas bactérias apresentam um conjunto de respostas conhecido como “Mecanismo de Tolerância Ácida” ou “Acid Tolerance Response” (ATR), onde em uma breve exposição a um pH sub-letal as bactérias respondem com alterações fisiológicas para que possam sobreviver a exposições subsequentes a pH ácidos, caracterizando um aumento da resistência aos ácidos (Lemos *et al.*, 2005), (Broadbent *et al.*, 2010).

Estudos descrevem os mecanismos utilizados por *S. mutans* para sobreviver em ambientes acidificados como aqueles encontrados no biofilme cariogênico (Len *et al.*, 2004), (Gong *et al.*, 2009), (Liu *et al.*, 2015), (Baker *et al.*, 2017). Dentre eles, destaca-se a extrusão de prótons H⁺ para o exterior da célula, que é conseguido pela atuação de uma bomba de prótons F₁F₀-ATPase que desempenha um papel importante na regulação do pH citoplasmático mantendo-o mais alcalino em relação ao meio extracelular (Gong *et al.*, 2009). Em *S. mutans* a bomba F₁F₀-ATPase tem seu funcionamento ótimo em um pH mais baixo que o de muitos outros microrganismos, o que contribui significativamente para aciduricidade desde microorganismo (Baker *et al.*, 2017). A atividade da bomba é desempenhada por proteínas que são codificadas pelos genes *atpA*, *atpB*, *atpC*, *atpD*, *atpE*, *atpG* e *atpH* (Gong *et al.*, 2009) (Baker *et al.*, 2015) (Figura 1 ilustrada a proteína responsável pela F-ATPase).

Alterações na membrana celular também é um outro mecanismo de tolerância ácida utilizado por bactérias orais (Fozo *et al.*, 2004). Em *S. mutans* ocorrem modificações na proporção de ácidos graxos de cadeia longa monoinsaturados (C_{18:1} e C_{20:1}). Esta modificação ocorre tanto pela incorporação de ácidos graxos exógenos, quando pela síntese de novos; e uma diminuição de ácidos graxos saturados (C_{14:0} e C_{16:0}) (Gong *et al.*, 2009), (Fozo *et al.*, 2004), (Lemos *et al.*, 2017). Sabe-se que estas alterações são importantes para que *S. mutans* sobreviva em ambiente ácido, mas sua verdadeira função e como essas modificações contribuem para aciduricidade ainda não está bem reportada. Acredita-se que ocorre alterações na permeabilidade da membrana para prótons (Baker *et al.* 2017). Os genes *accA*, *accD*, *fabZ*, *fabG*, *fabD*, *fabH*, *fabM*, *fabF*, *acp*, *fabk2*, *cls* estão envolvidos nesse processo (Baker *et al.*, 2015) (Figura 1 ilustra as modificações que ocorrem na parede celular bacteriana).

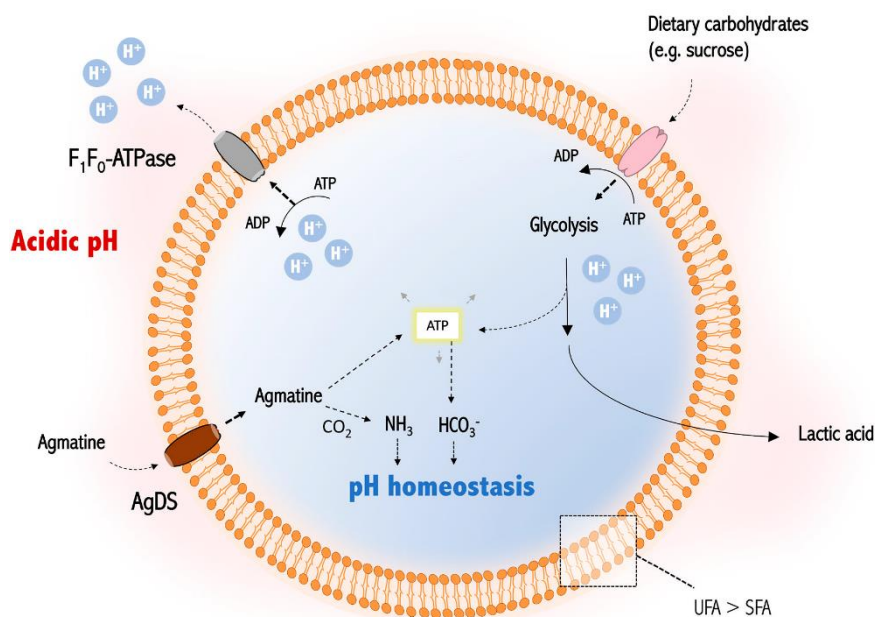
Proteínas de reparo e degradação de DNA são de extrema importância para sobrevivência de bactérias em ambientes ácidos, pois a acidificação intracelular pode resultar em uma perda de purinas e pirimidinas do DNA além de induzirem alterações estruturais nessas macromoléculas e comprometerem a viabilidade microbiana. Em *S. mutans* genes que codificam proteínas responsáveis por desenvolverem essas funções foram mais expressos quando este microrganismo cresce em pH ácido em comparação ao crescimento em um ambiente com pH neutro (Baker *et al.*, 2017). Os genes associados a este mecanismo são: *uvrA*, *smn (end3)*, *mutY* (Hanna *et al.*, 2001), (Baker *et al.*, 2015).

Sistemas regulatórios como o Sistema de Dois-Componentes (Two-component system) são importantes para sobrevivência de bactérias, pois este permite que elas tenham a capacidade de sentir modificações no ambiente e assim regularem a expressão gênica em resposta a esses estímulos, permitindo sua sobrevivência (Baker *et al.*, 2017). O sistema de dois componentes apresenta um sensor de quinase na membrana que permite as bactérias sentirem as modificações no ambiente e uma proteína que se liga ao DNA que modula a expressão gênica. Este mecanismo está presente e bem reportado em *S. mutans* (Lemos *et al.*, 2008), (Baker *et al.*, 2017), (Lemos *et al.*, 2017). Por exemplo o *liaS* que é um gene que faz parte do sistema regulatório de dois-componentes presente em *S. mutans* que irá regular a expressão de genes essenciais para formação de biofilme e participa na regulação da secreção de mutacina, uma que é bacteriocina produzida por esse microorganismo para suprimir o crescimento de outras bactérias concorrentes presentes na placa dentária. Sabe-se também que mutações no *liaS* em *S. mutans* resultou na formação de biofilmes defeituoso e em um fenótipo sensível ao ácido, além de da sua capacidade acidogênica ser diminuída (Zhang & Biswas 2009), (Gong *et al.*, 2009). Os genes *ciaR*, *ciaH*, *comD*, *comE*, *lisS*, *liaR*, *levR*, *levS* e *covS* são alguns genes responsáveis por esse mecanismo em *S. mutans* (Gong *et al.*, 2009).

Outro mecanismo conhecido para sobrevivência de bactérias em ambientes ácidos é através da expressão da via agmatina deiminase, este mecanismo cataboliza a agmatina, uma forma descarboxilada de arginina, e gera putrescina, CO₂, amônia e ATP, que irão contribuir para a regulação do pH citoplasmático (Baker *et al.*, 2017). Além disso, o ATP gerado neste mecanismo ainda contribui para a extrusão de prótons pela bomba F₁F₀-ATPase, que como descrito anteriormente, auxilia na manutenção de um pH mais alcalino em relação ao pH do meio (Liu *et al.*, 2015), (Lemos *et al.*, 2008), (Baker *et al.*, 2017).

Em *S. mutans* os genes responsáveis por esse mecanismo são: *otcA* e *aguA* (Grisworld *et al.*, 2004), (Grisworld *et al.*, 2006) (Figura 1).

Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que superfícies radiculares que apresentam lesão cáriosa possuem um aumento da abundância de microrganismos que se desenvolvem em condições de baixo pH (Damé-Teixeira *et al.*, 2018). Como já conhecido, variações ambientais são capazes de influenciar na expressão gênica de bactérias (Gong *et al.*, 2009). Nesse sentido, as evidências acerca dos mecanismos de tolerância ácida utilizados pelos *S. mutans* foram obtidas a partir de estudos *in vitro* nos quais essas bactérias foram analisadas isoladamente e sob condições experimentais laboratoriais. Considerando a complexidade microbiana dos biofilmes dentais e potenciais interações microbianas que ocorrem nesse ambiente microbiologicamente diverso, torna-se necessário analisar quais os mecanismos de tolerância ácida estão sendo expressos em biofilme polimicrobianos e sob condições clinicamente relevantes em cárie radicular.



Adaptada de Lemos *et al.*, 2019

Figura 1. Ilustração dos mecanismos de tolerância ácida: bomba de prótons F_1F_0 -ATPase; sistema Agmatina Deiminase; alterações na membrana celular UFA (ácidos graxos de cadeia longa monoinsaturados) > SFA (ácidos graxos saturados).

2 OBJETIVO

Dessa forma, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância ácida de *S. mutans* em biofilme coletado da porção radicular em pacientes livres de cárie e cárie ativos. A hipótese desse trabalho é de que os mecanismos de tolerância ácida são diferencialmente expressos entre biofilmes associados ou não-associados à lesões cáries ativas.

Os objetivos específicos são:

- Verificar a quantidade de *reads* de genes de tolerância ácida e compará-la entre pacientes livres de cárie x cárie ativos;
- Verificar qual(is) gene(s) apresenta(m) maior expressão diferencial em pacientes livres de cárie x cárie ativos;
- Verificar qual(is) mecanismo(s) responsável(is) pela tolerância ácida apresenta(m) maior expressão em pacientes livres de cárie x cárie ativos;
- Descrever as principais vias metabólicas associadas aos genes que apresentam expressão diferencial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foram utilizados dados de biblioteca genômica (domínio público), depositada no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), criada a partir de um estudo prévio denominado “Metatranscriptoma de cárie radicular” que foi desenvolvido em colaboração entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Universidade de Leeds (Reino Unido).

Seleção dos pacientes, coleta e preparo das amostras

A seleção dos pacientes, coleta e preparo das amostras foram realizados e descritos por (Damé-Teixeira *et al.*, (2016). Aquele estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (processo n ° 427.168) e pelo Comitê de Ética do Comitê Nacional de Serviço de Ética em Pesquisa Yorkshire & The Humber - Leeds West (protocolo n ° 2012002DD). Os participantes do estudo foram pacientes que compareceram às clínicas odontológicas para tratamento odontológico em dois centros: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; e Faculdade de Odontologia, Universidade de Leeds, Leeds, Reino Unido. Todos os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início do estudo.

Resumidamente, foram selecionados participantes que apresentassem pelo menos uma superfície radicular exposta sem lesões de cárie dentária (grupo superfície radicular hígida - SRS) (n=10). Os participantes selecionados para o grupo cárie radicular (RC) (n=30) apresentavam pelo menos uma lesão primária cativada que necessitava de tratamento restaurador. Todas as lesões mostraram características de cárie ativa (dentina mole e amarela), seguindo os critérios de diagnóstico de RC por meio de exame visual-tátil (Nyvad e Fejerskov, 1982). Biofilmes dentais (do grupo SRS) e biofilme/dentina (do grupo RC) foram coletados de todas as superfícies radiculares expostas disponíveis. Todas as amostras foram coletadas dos participantes durante o tratamento da doença cárie.

Após a coleta clínica, as amostras de biofilme e biofilme/dentina foram imediatamente colocadas em um microtubo livre de nuclease contendo 1 mL do reagente RNAprotect (QIAGEN, Inc., Venlo, Holanda). Esses tubos foram levados para o

laboratório para serem centrifugado a 10.000x g por 30 s. As amostras foram armazenadas a -80°C até o processamento. O RNA total foi extraído de todas as amostras usando um kit de isolamento de RNA microbiano UltraClean † (Mo-BIO Laboratories, Inc., San Diego, CA), em coluna para degradação com DNase (QIAGEN, Inc., Venlo, Holanda). O RNA extraído das amostras foi quantificado usando Kit de Ensaio QuantiTTM RiboGreen® RNA (Invitrogen, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) e amostras com concentração total de RNA <30 ng/RNA foram agrupadas. Esse processo resultou em 10 do grupo SRS e 9 amostras do grupo RC.

Utilizou-se o kit Meta-Bactérias Ribo-Zero TM (Epicentro, Illumina) para o enriquecimento de RNAm e utilizaram-se protocolos de preparação da biblioteca Illumina®TruSeq TM (Illumina, San Diego, CA) para preparação e sequenciamento da biblioteca com Illumina HiSeq2500. Os dados de sequenciamento de RNA-seq das amostras descritas acima estão disponíveis no arquivo de leitura de sequências do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), sob os números de acesso SRS779973 e SRS796739. Os arquivos FASTQ foram obtidos para cada amostra e importados para o software CLC Genomics Workbench 7.5.1 (CLC Bio, Qiagen) para mapeamento contra 162 genomas microbianos orais, para a lista de genomas, verificar (Damé-Teixeira *et al.*, 2016). O número de leituras de sequência que foram atribuídas a cada gene é considerado como a data da contagem de leitura (*reads*).

Genoma e análise de *Streptococcus mutans*

O *Streptococcus mutans* UA159 foi o genoma selecionado para este estudo. Essa cepa foi escolhida uma vez que seu genoma já está totalmente sequenciado e, sendo assim, há uma grande quantidade de informações disponível na literatura sobre genes e suas respectivas funções. Primeiramente, informações associadas aos 162 genomas microbianos orais foram obtidas a partir do Banco de Dados de DNA do Japão, NCBI, Instituto Broad e HOMD (Banco de Dados de Microbiomas Humanos Humanos – domínio público). O genoma de referência do *S. mutans* UA 159 foi descrito anteriormente e obtido para realizar as análises. Esse genoma contém 1958 genes (Ajdić *et al.*, 2002). Os genes pertencentes ao genoma do *S. mutans* UA159 foram então manualmente extraídos dos 162 genomas presentes nas amostras analisadas.

Em seguida, foi realizada uma busca na literatura (utilizando os descritores: “*S. mutans*”, “acid tolerance”, “acid tolerance genes”, “acid-adaptive response”; “bacterial pathogenesis”; “dental caries”; “oral streptococci”; “stress response”; “transcriptome”; “genomic characterization”) para identificar quais genes presentes em *S. mutans* estão associados aos mecanismos de tolerância ácida. Essa busca identificou 225 genes (Tabela 1). Esses genes, foram então utilizados como alvo para realização das análises a seguir.

Análise dos dados

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória a fim de verificar o número total, média, mediana, quartis e amplitude dos *reads* referentes ao total de 225 genes de tolerância ácida. As medianas dos grupos SRS e RC foram comparadas estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ao nível de significância de 5%. A análise estatística para inferir a expressão diferencial de genes entre os grupos SRS e RC foi realizada usando o pacote R DESeq2 (Love et al., 2014). O ponto de corte para considerar um gene como sendo expresso diferencialmente foi uma alteração nos níveis de transcrição de pelo menos 1 log2fold change (valores negativos = super-expresso em SRS, valores positivos = super-expressos RC) e Benjamini-Hochberg – onde o valor de p ajustado (padj) foi considerado menor que 0,001. Esse alto ponto de corte foi escolhido para evitar resultados falso-positivos e identificar com maior precisão apenas as diferenças entre os grupos. O número total, média, mediana, quartis e amplitude dos *reads* referentes aos genes diferencialmente expressos foram calculados e as medianas dos grupos SRS e RC foram comparadas estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ao nível de significância de 5%. As vias metabólicas foram obtidas através da plataforma KEGG (Kyoto enciclopédia de genes e genomas) e informações gênicas foram obtidas da plataforma UniProt com intuito de uma melhor compreensão da função de cada gene que apresentou expressão diferencial.

Tabela 1. Genes identificados na literatura como possivelmente responsáveis pela tolerância ácida em *S. mutans*.

Gene	Referência
<i>ciaH, ciaR, levR, comD, comE, lias, scnR, scnK, levS, liaR.</i>	Gong <i>et al.</i> , 2009
<i>pnpA, ssb, recA, greA, ropA, groEL, dnaK, gatA, gatB, syfA, sytI.</i>	Len <i>et al.</i> , 2004
<p><i>SMU_1914c (NlmC), SMU_1906c, SMU_423 (NlmD), mutY, end3, rs1, rs11, rs13, rs5, rs8, rl1, rl14, rl16, rl24, rl29, rl5, rl6, rs14, fabZ, accA, accD, fabD, fabG, fabH, fabK, dnaI, holB, recJ, rpoA, ftsH, ftsW, ftsX, SMU.1261c, glnA, proC, hisA, hisB, ilvE, ilvB, nifS, cysK, spaP, mreC, mreD, dltC, dltD, murC2, pbp2a, pbp2x, pgm, ffh, thiD, SMU_1039c, SMU_117c, SMU_196c, SMU_911c, SMU_929c, SMU_1560, SMU_1646c, SMU_1701c, SMU_1706, SMU_1807c, sod, ahpC, dpr, tpx, gshR, SMU.1828, SMU.765, pfk, gapN, adhA, adhB, adhC, adhD, alsS, aldB, naoX, glk, eno, pfkB, adhE, ackA, scrB, treA, glgD, glgC, glgB, glgP, bglA, dexA, SMU.125, trxB, lguL, SMU.275, clpE, thdF, grpE, pepA, SMU_132, SMU_1940c, lplA, SMU_143c, SMU_2043c, sys, purL, purF, purM, purN, pyrA, pyrAB, pyrB, pyrD, pyrDB, pyrE, pyrF, pyrK, ftsH, purH, SMU_991, SMU_2071, nrdD, SMU_29, glnR, copY, furR, malR, ccpA, brpA, fruR, pyrR, cpsY, fabT, SMU_124, SMU_161, SMU_168, SMU_953c, SMU_1647c, SMU_1097c, EI, ptsH, bglP, scrA, pttB, ptnA, ptnC, ptcC, ptsG, ptxA, SMU.1958c, SMU_1037c, SMU_1038c, covS, copZ, sloC, malF, malX, malG, SMU.653c, opuBa, SMU_652c (SsuB), glpF, SMU_995, SMU_996, nrgA, SMU_857, SMU_706c, SMU_1881c, SMU_1897, SMU_459, SMU_524, SMU_525, SMU_602, SMU_651c, SMU_746c, SMU_747c, SMU_923, SMU_1938c, SMU_1939c, trk, trkA, trkB, pacL, copA, copY, atpA, atpB, atpC, atpD, atpE, atpF, atpG, atpH.</i></p>	Baker <i>et al.</i> , 2015
<i>uvrA</i>	Hanna <i>et al.</i> , 2001
<i>rgpF</i>	Kovacs <i>et al.</i> , 2017
<i>luxS, dagK, clpP, hrcA.</i>	Lemos <i>et al.</i> , 2005
<i>aguA</i>	Griswold <i>et al.</i> , 2006
<i>otcA</i>	Griswold <i>et al.</i> , 2004

4 RESULTADOS

Distribuição das amostras

De acordo com a quantidade mínima de RNA em cada amostra para realizar as análises ($\leq 30\text{ng} / \text{RNA}$), o grupo de biofilmes SRS resultou em 10 bibliotecas genômicas e o grupo RC resultou em 9 bibliotecas genômicas (Figura 2).

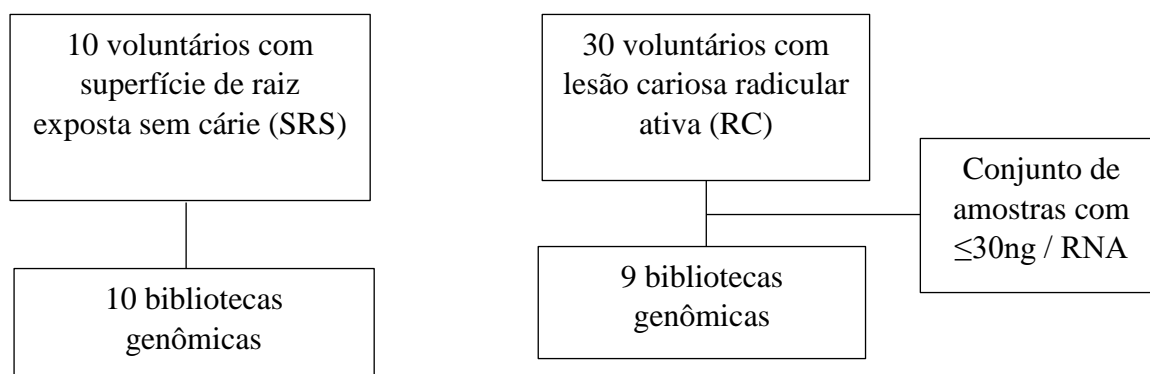


Figura 2. Fluxograma das bibliotecas genômicas em relação a cada grupo.

Análise exploratória e de expressão diferencial

Considerando o total de 225 genes potencialmente relacionados à tolerância ácida, a Tabela 2 abaixo mostra que a mediana de *reads* no grupo RC é superior àquela encontrada nas amostras SRS. Esses genes estão relacionados com as seguintes funções: degradação de RNA, formação de biofilme, sistema arginina deiminase, produção ou resistência á toxinas, reparação de DNA, codificação de subunidades ribossomais, biossíntese de ácidos graxos, replicação e divisão celular, biossíntese de aminoácidos, atividade de membrana, estresse oxidativo, energia e metabolismo central, reparo de proteínas e degradação, síntese de nucleotídeos e nucleosídeos, tradução, codificação de fatores de transcrição, sistema fosfotransferase do açúcar, sistema de dois componentes, transporte e ligação, transporte de potássio e cobre e extrusão de prótons.

Tabela 2. Número total, média, mediana, quartis e amplitude (mínimo – máximo) de reads de todos os genes de tolerância ácida (n=225 genes) em cada grupo analisado:

Grupo	Total de reads	Mediana de reads	Quartis (25/75)	Mínimo - Máximo
SRS	7,6 x 10 ⁴	0,0 ^a	0,0 – 3,0	0 – 3.858
RC	300,0 x 10 ⁴	484,0 ^b	129 – 1.470	0 – 93.327

Medianas seguidas por letras sobrescritas distintas diferem estatisticamente entre pelo teste de Mann-Whitney (p<0,001)

Dos 225 genes analisados (e potencialmente relacionados à tolerância ácida), 69 (30% em relação ao total) apresentaram expressão diferencial no grupo RC e nenhum gene apresentou expressão diferencial no grupo SRS (seguindo os critérios descritos anteriormente: alteração nos níveis de transcrição de pelo menos 1log₂fold change e valor de P ajustado menor que 0,001) (Tabela 3). De todas as funções associadas aos genes de tolerância ácida, apenas duas delas (degradação de RNA e transporte de potássio e cobre) não apresentaram seus respectivos genes com expressão diferencial.

Tabela 3. Genes que apresentaram expressão diferencial em biofilmes radiculares com cárie.

Função	nº genes (% em relação ao total de genes da função*)	Genes	log ₂ Fold	p. ajustado
Formação de Biofilme e metabolismo de cisteína	1 (100%)	<i>luxS</i>	6,56	4,79E-12
Agmatina Deiminase	2 (100%)	<i>otcA</i> <i>aguA</i>	6,74 6,07	1,58E-10 3,38E-09
Produção ou resistência a toxinas	3 (100%)	<i>SMU_1914c</i> (<i>NlmC</i>) <i>SMU_1906c</i> <i>SMU_423 (NlmD)</i>	8,12 7,70 7,95	2,29E-11 8,89E-16 5,00E-13
Reparação de DNA	1 (33,3%)	<i>end3 (smn)</i>	4,82	0,000937768
Biossíntese de ácidos graxos	1 (14,28%)	<i>fabH</i>	7,18	2,40E-11
Replicação e divisão celular	1 (100%)	<i>greA</i>	7,08	9,87E-12

*Genes identificados pela busca da literatura

Tabela 3 (cont). Genes que apresentaram expressão diferencial em biofilmes radiculares com cárie.

Função	nº genes (% em relação ao total de genes da função*)	Genes	log2Fold	p. ajustado
Biossíntese de aminoácidos	4 (44,44%)	<i>SMU_1261c (hisE)</i>	6,73	9,97E-11
		<i>hisA</i>	4,77	8,74E-05
		<i>ilvE</i>	4,64	0,000147324
		<i>hisB</i>	4,63	0,001025519
Parede Celular	12 (50%)	<i>spaP</i>	4,71	0,000136354
		<i>mreC</i>	7,20	1,46E-08
		<i>mreD</i>	8,45	2,08E-14
		<i>murC2</i>	4,56	0,000890623
		<i>pbp2a</i>	4,87	0,000804216
		<i>dagK</i>	6,66	4,32E-09
		<i>SMU_911c</i>	9,25	4,02E-16
		<i>SMU_929c</i>	8,03	2,97E-19
		<i>SMU_1560</i>	7,37	4,32E-13
		<i>SMU_1646c</i>	8,13	1,68E-13
Estresse oxidativo	1 (14,28%)	<i>Tpx</i>	8,30	7,98E-17
Energia e metabolismo central	6 (22,22%)	<i>pfk</i>	4,65	0,000760736
		<i>adhE</i>	4,63	0,000580787
		<i>eno</i>	4,50	0,000272191
		<i>pfkB</i>	4,65	0,000760736
		<i>glgC</i>	4,15	0,000877011
		<i>bglA</i>	4,80	0,000983863
Proteína de reparo e degradação	1 (6,66%)	<i>SMU_143c</i>	7,86	1,26E-15
Síntese de nucleotídeos e nucleosídeos	9 (50%)	<i>purL</i>	4,77	0,000137132
		<i>purM</i>	4,28	8,66E-05
		<i>pyrD</i>	7,42	1,26E-13
		<i>pyrDB</i>	7,23	3,96E-14
		<i>pyrK</i>	7,31	2,12E-10
		<i>purH</i>	4,19	0,000534169
		<i>SMU_991</i>	8,02	6,52E-15
		<i>SMU_2071</i>	7,79	6,23E-12
		<i>SMU_29</i>	7,18	2,11E-14

*Genes identificados pela busca da literatura

Tabela 3 (cont). Genes que apresentaram expressão diferencial em biofilmes radiculares com cárie.

Função	nº genes (% em relação ao total de genes da função*)	Genes	log2Fold	p. ajustado
Genes envolvidos na tradução	1 (25%)	<i>syfA</i>	7,72	9,08E-14
Genes que codificam reguladores de fatores de transcrição.	7 (41,17%)	<i>glnR</i>	4,67	0,00076976
		<i>furR</i>	7,23	2,34E-11
		<i>fabT</i>	6,81	4,08E-12
		<i>pyrR</i>	7,61	7,56E-16
		<i>SMU_161</i>	7,96	4,51E-14
		<i>SMU_168</i>	8,67	1,14E-10
		<i>SMU_1647c</i>	8,02	2,15E-14
Sistema de fosfotransferase de açúcar bacteriano	3 (27,27%)	<i>scrA</i>	4,57	0,000658811
		<i>ptnA</i>	4,50	0,000664596
		<i>ptnC</i>	4,02	0,00106175
Sistema de dois componentes	6 (46,15%)	<i>comD</i>	4,28	0,001023453
		<i>comE</i>	6,92	1,44E-10
		<i>liaS</i>	7,65	5,26E-13
		<i>liaR</i>	4,64	0,000858341
		<i>levR</i>	7,63	1,44E-10
		<i>levS</i>	8,18	7,14E-14
		<i>SMU_653c</i>	8,06	2,44E-12
		<i>SMU_652c (SsuB)</i>	7,90	1,57E-13
		<i>glpF</i>	8,45	3,18E-12
		<i>nrgA</i>	8,64	6,63E-14
Transporte e ligação	9 (34,61%)	<i>SMU_706c</i>	6,99	4,07E-13
		<i>SMU_1897</i>	7,94	4,71E-07
		<i>SMU_459</i>	7,68	2,68E-14
		<i>SMU_602</i>	8,65	4,29E-18
		<i>SMU_651c</i>	7,09	2,08E-10
Extrusão de prótons	1 (12,5%)	<i>atpH</i>	6,80	5,88E-10

*Genes identificados pela busca da literatura

Considerando o total de 69 genes que apresentaram expressão diferencial, a Tabela 4 abaixo mostra que a mediana de *reads* no grupo RC é superior àquela encontrada nas amostras SRS. Do ponto de vista funcional, e em termos percentuais, cerca de 17,4% dos genes diferencialmente expressos estão associados com funções de membrana, enquanto que 13% desses estão relacionados com síntese de nucleotídeos/nucleosídeos ou transporte e ligação; e 10,1% dos genes estão associados com codificação de fatores

de transcrição (Figura 2). Além disso, com exceção das funções formação de biofilme, sistema agmatina deiminase, produção ou resistência á toxinas, e replicação e divisão celular, onde todos os genes identificados e associados á tais funções foram diferencialmente expressos, é importante mencionar que uma expressão diferencial foi parcialmente encontrada nos genes associados ás demais funções, variando de 6% a 50% dos genes identificados (Figura 3).

Tabela 4. Número total, média, mediana, quartis e amplitude (mínimo – máximo) de reads dos genes que apresentaram expressão diferencial (n=69 genes)

Grupo	Total de reads	Mediana de reads	Quartis (25/75)	Mínimo - Máximo
SRS	$1,2 \times 10^4$	0,0 ^a	0,0 – 2,0	0 -2.090
RC	$57,0 \times 10^4$	167,0 ^b	58,0 – 613,75	0 – 40.546

Medianas seguidas por letras sobrescritas distintas diferem estatisticamente entre pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,001$)

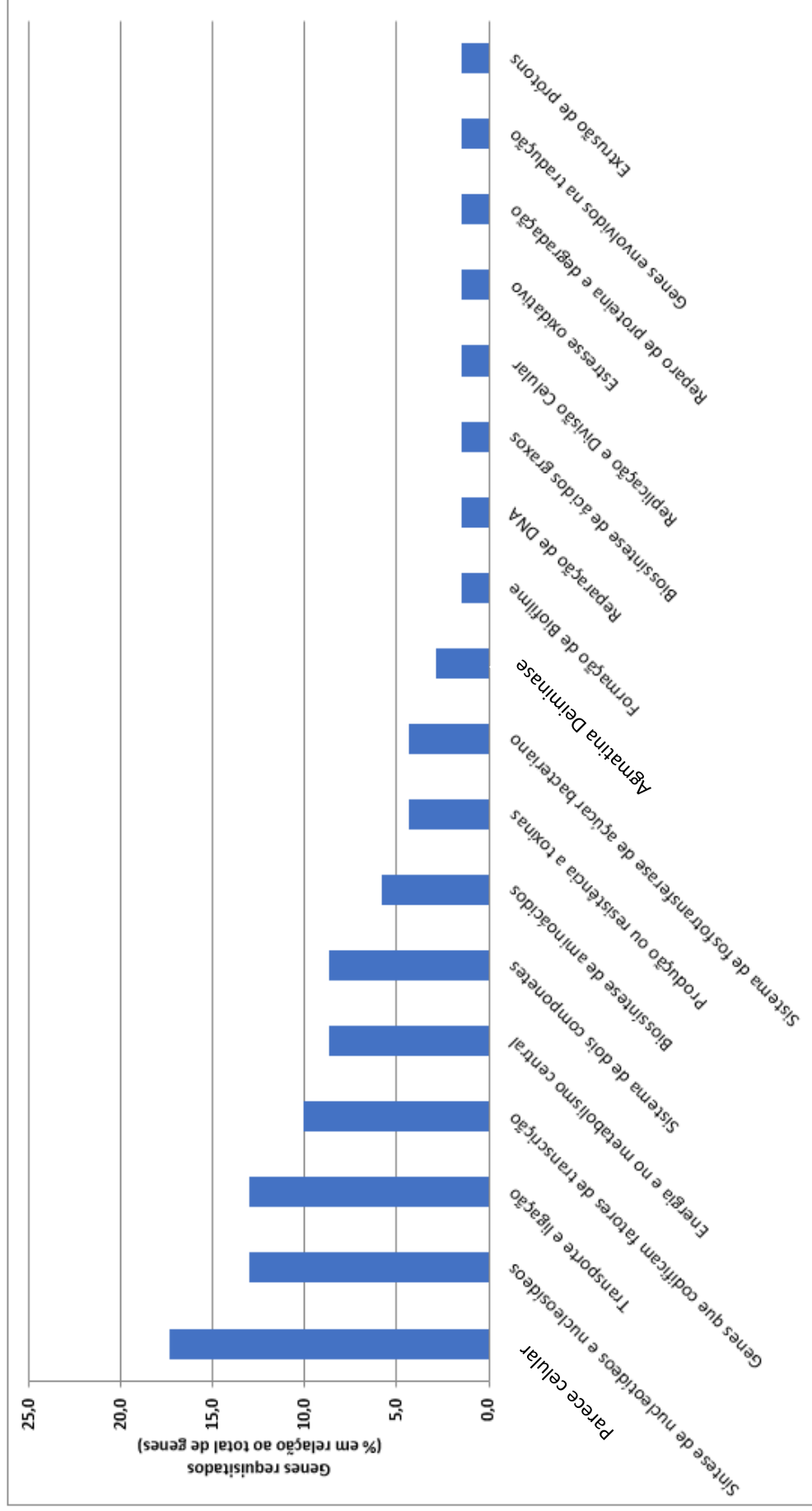


Figura 2. Porcentagem de genes diferencialmente expressos (n=69) relacionados as funções de tolerância ácida.

Resultados das análises das rotas metabólicas

Dos 69 genes diferencialmente expressos, as rotas metabólicas de apenas 37 genes estavam disponíveis na plataforma KEGG (descritas a seguir).

O gene *luxS* está relacionado com a formação de biofilme e com a análise da sua rota metabólica foi possível inferir que o mesmo está relacionado com o metabolismo de cisteína (Figura 4). O gene *aguA* está ligado ao sistema agmatina deminase que leva à produção de putrescina que está associada à produção de compostos alcalinos e também atuar como intermediária do metabolismo de alanina, aspartato, butanoato e glutamato (Figura 5). Os genes *comD/comE* são estão ligados ao mecanismo do Sistema de Dois-Componentes e os genes *SMU_1914c/SMU_423* estão relacionados com a produção de bacteriocinas (Figura 6). O gene *end3 (smn)* está relacionado com o reparo de DNA (Figura 7). O gene *fabH* participa da biossíntese de ácidos graxos e esta função está associada às modificações de lipídios da membrana plasmática (Figura 8). Os genes *SMU_1961c, hisA, hisB* estão associados à via de pentose-fosfato, podendo progredir para metabolismo de purina ou de histidina, que por sua vez poderá estar associado ao metabolismo de aspartato, glutamato e alanina (Figura 9.1) (como também verificado na Figura 5). O gene *ilvE* está ligado a produção de aminoácidos de cadeias ramificadas que são: valina, leucina e isoleucina (Figura 9.2). Os genes *dagK, murC2, pbp2a* participam da biossíntese de peptidoglicanos (Figura 10). O gene *eno* realiza a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato que é um precursor da síntese de piruvato, que posteriormente pode ser convertido em ácido láctico. O gene *adhE* realiza a conversão do 2-hidroxi-etil-ThPP (produzido a partir do piruvato) em acetaldeído que será convertido posteriormente em etanol (Figura 11.1). O gene *bglA* realiza o transporte de carboidratos de fontes vegetais e o gene *glgC* está relacionado com a síntese de glicogênio (Figura 11.2). O gene *pfk* converte a frutose-6P em frutose-1,6 bifosfato, enquanto gene *pfkB* converte a frutose-1-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, portanto estes genes estão relacionados com a produção de energia (glicólise) (Figura 11.3). Os genes *purL, purM, SMU_29* estão relacionados a produção de nucleotídeos (adenina e guanina) (Figura 12.1). Os genes *pyrD, pyrDB, pyrK* participam do metabolismo de cistósina e timina; e a timina pode ser convertida em valina, leucina e isoleucina (como também descrito na Figura 9.2) enquanto o gene *pyrR* é um fator de transcrição (Figura 12.2). O gene *syfA* está envolvido com a síntese de tRNA e proteínas (Figura 13). O gene *scrA* converte a

sacarose em sacarose-6P e o gene *ptnA/ptnC* convertem a manose em manose-6P (Figura 14). Os genes *liaS* e *liaR* fazem parte do mecanismo de Sistema de Dois-Componentes, sendo que o gene *liaS* está ligado às respostas relacionadas à secreção de mutacinas e pela formação de biofilme, enquanto o gene *liaR* está relacionado com a formação do envelope celular (Figura 15). O gene *SMU_652c* está relacionado ao transporte de nitratos (Figura 16). E o gene *atpH* que é a subunidade C(gama) da F_1F_0 -ATPase (Figura 17)

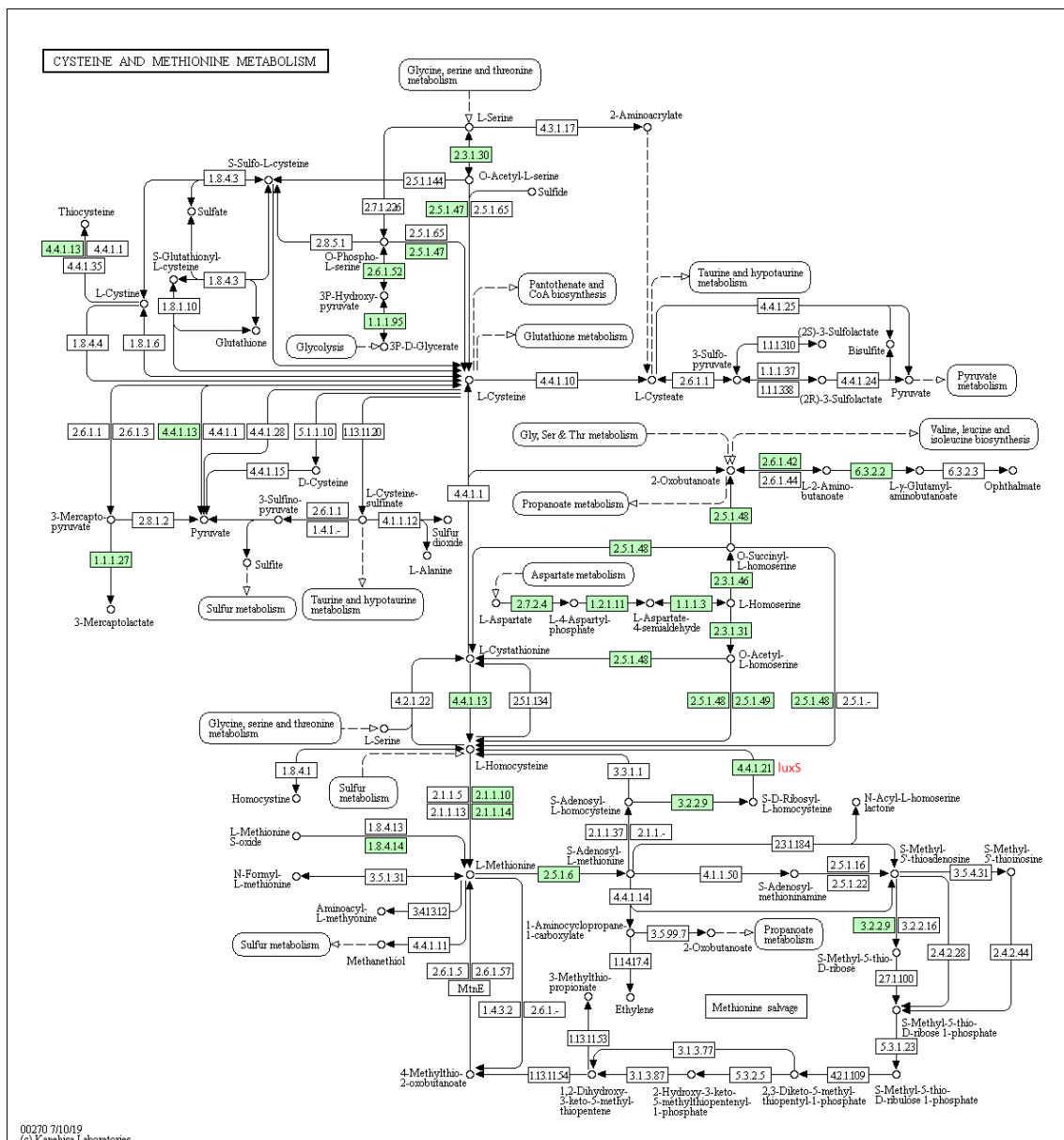


Figura 4. Rota metabólica do gene *luxS* obtida a partir da plataforma KEGG.

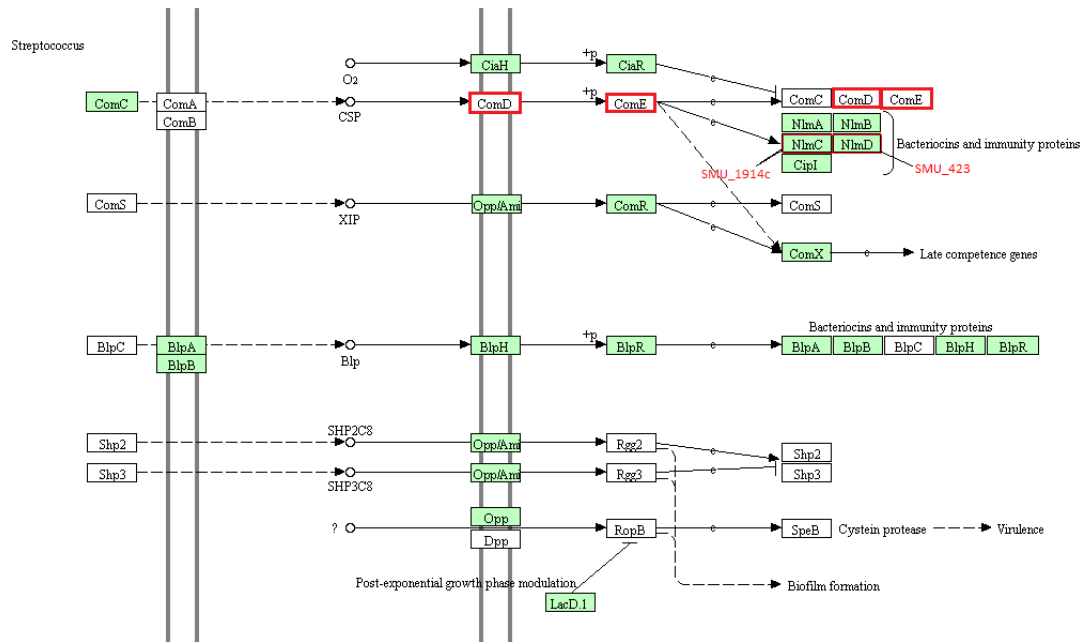


Figura 6. Rota metabólica dos genes *comD*, *comE*, *SMU_1914c* e *SMU_423* obtida a partir da plataforma KEGG.

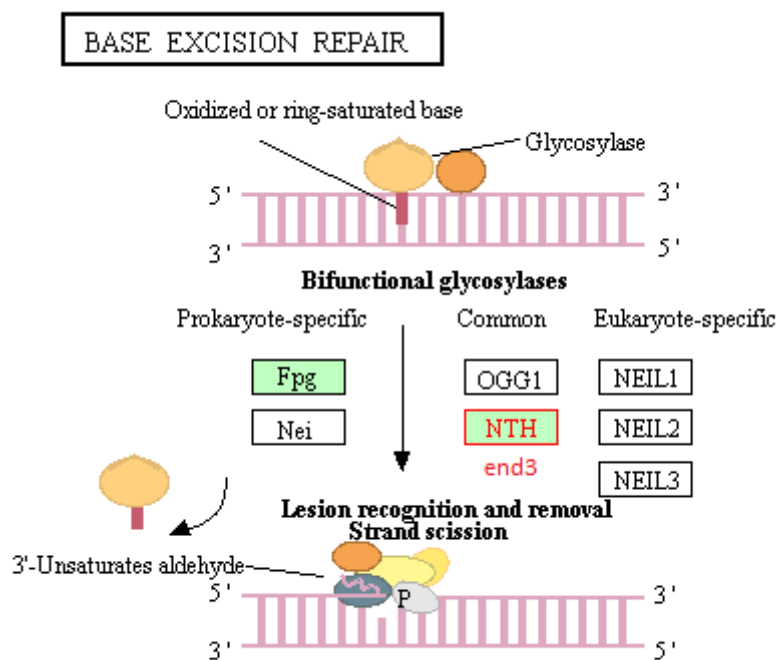


Figura 7. Rota metabólica do gene *end3* obtida a partir da plataforma KEGG.

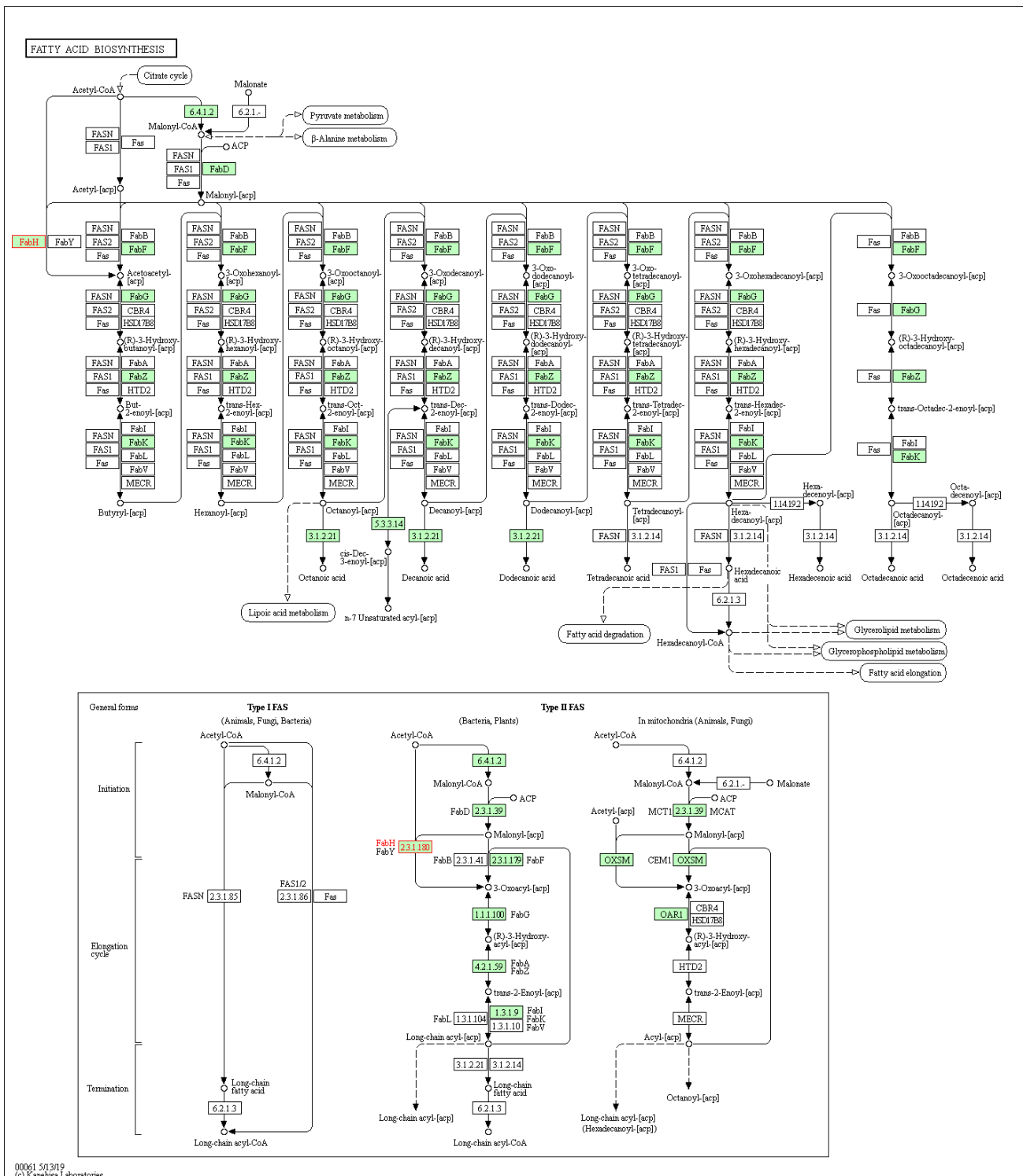


Figura 8. Rota metabólica do gene *fabH* obtida a partir da plataforma KEGG.

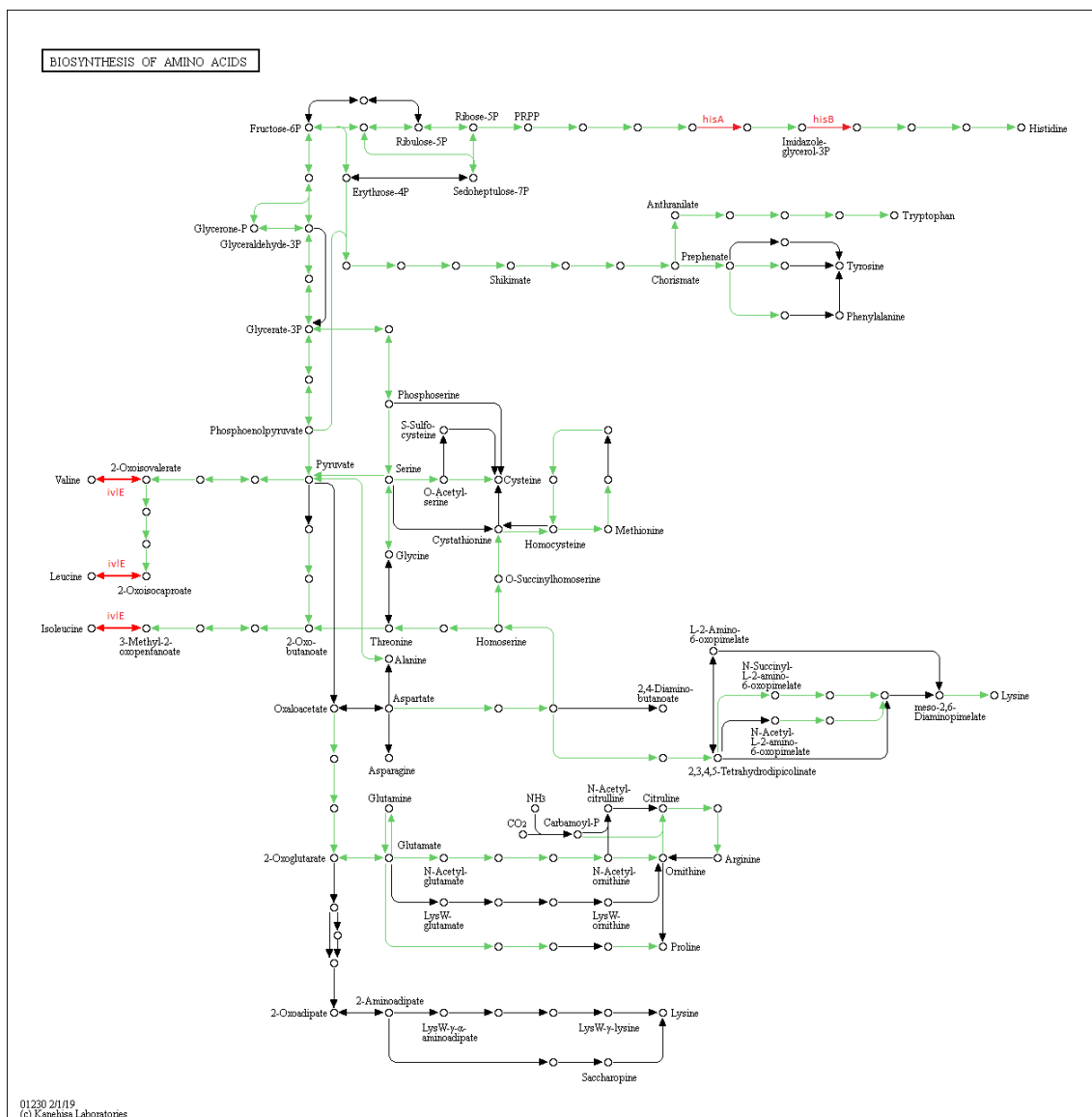


Figura 9.2. Rota metabólica dos genes *ivlE*, *hisA*, *hisB* obtida a partir da plataforma KEGG.

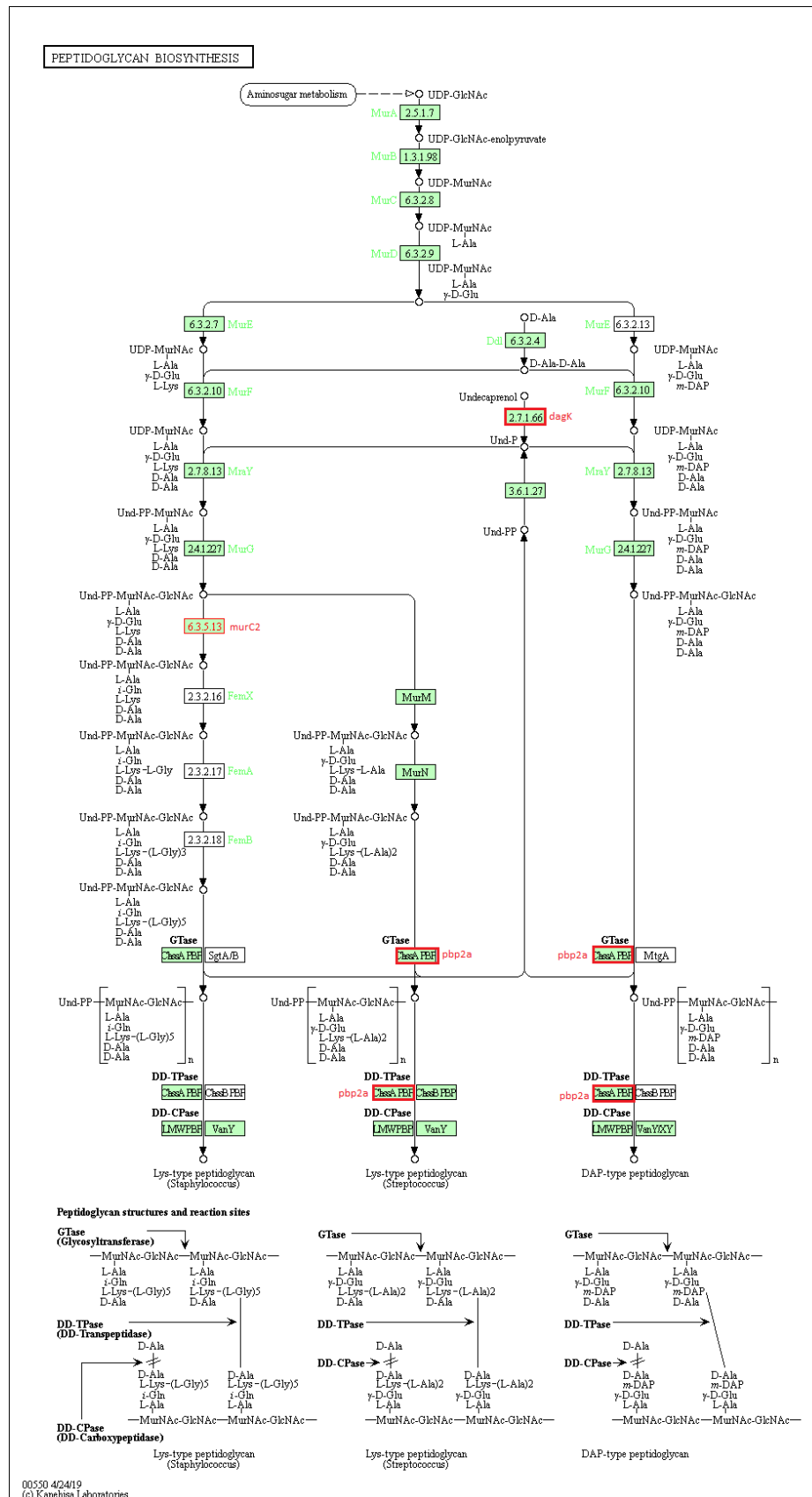


Figura 10. Rota metabólica dos genes *dagK*, *murC2*, *pbp2a* obtida a partir da plataforma KEGG.

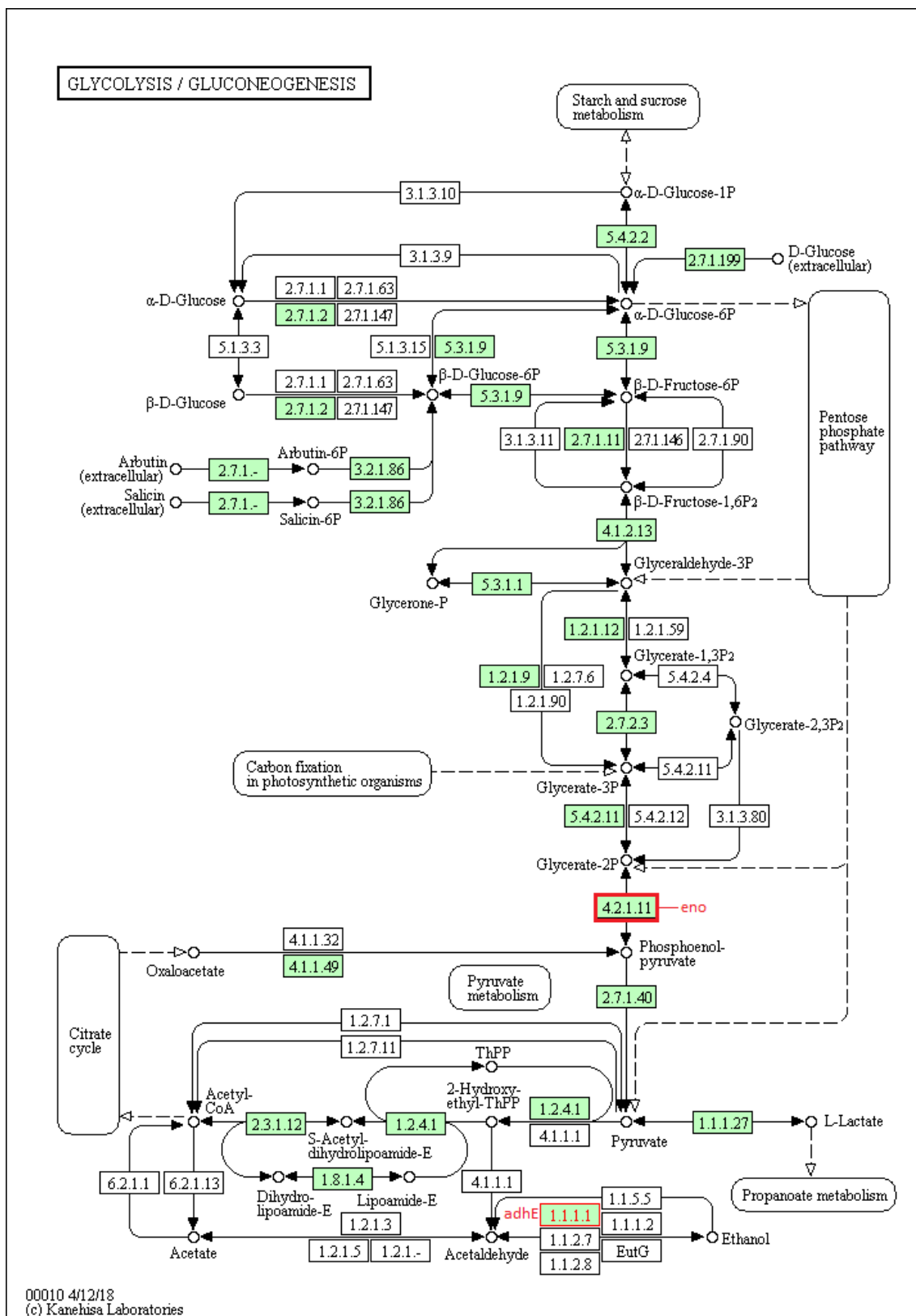


Figura 11.1. Rota metabólica dos genes *eno* e *adhE* obtida a partir da plataforma KEGG.

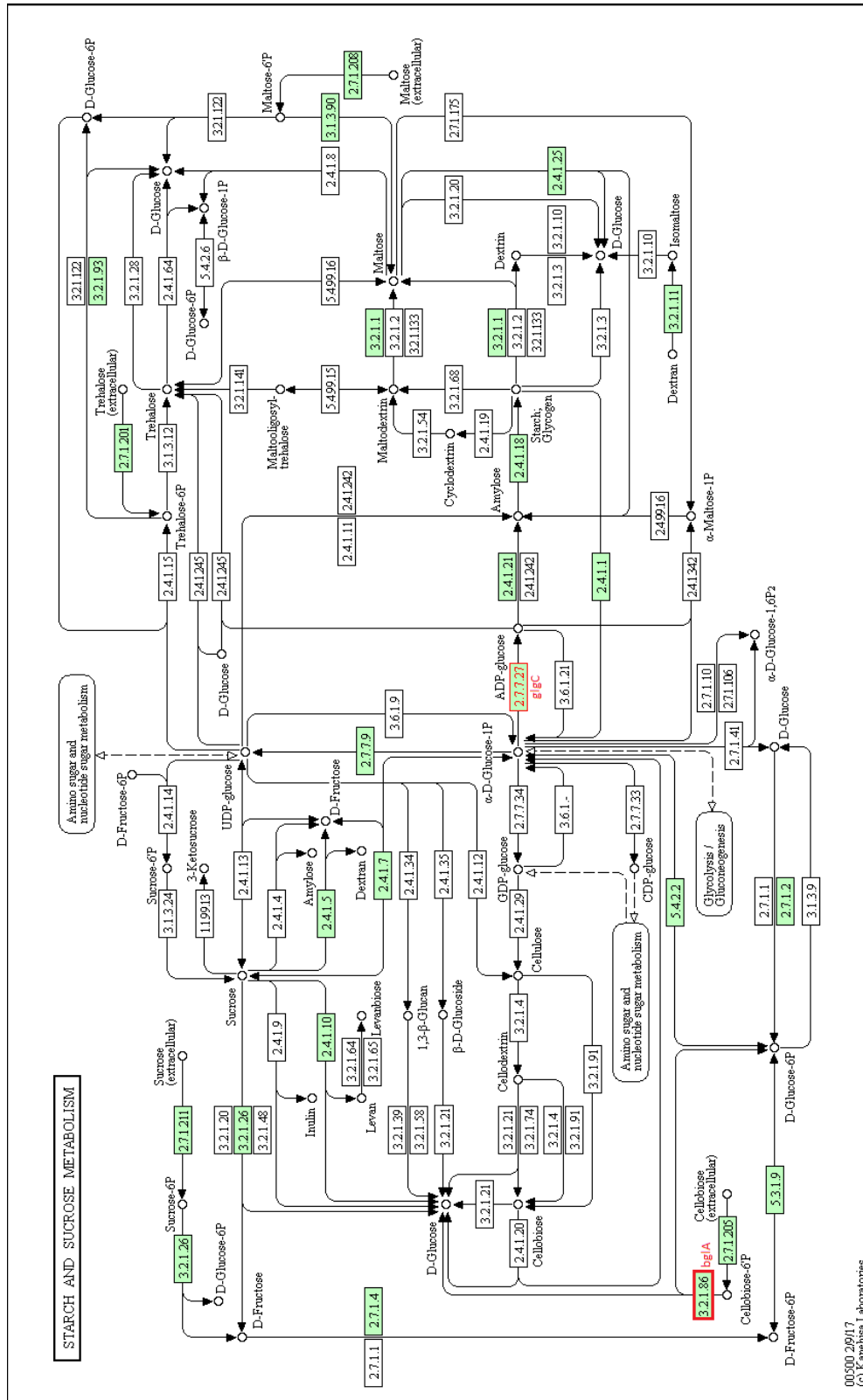


Figura 11.2. Rota metabólica dos genes *glgC* e *bglA* obtida a partir da plataforma KEGG.

00500_20017
© Kewalissa_Laboratories

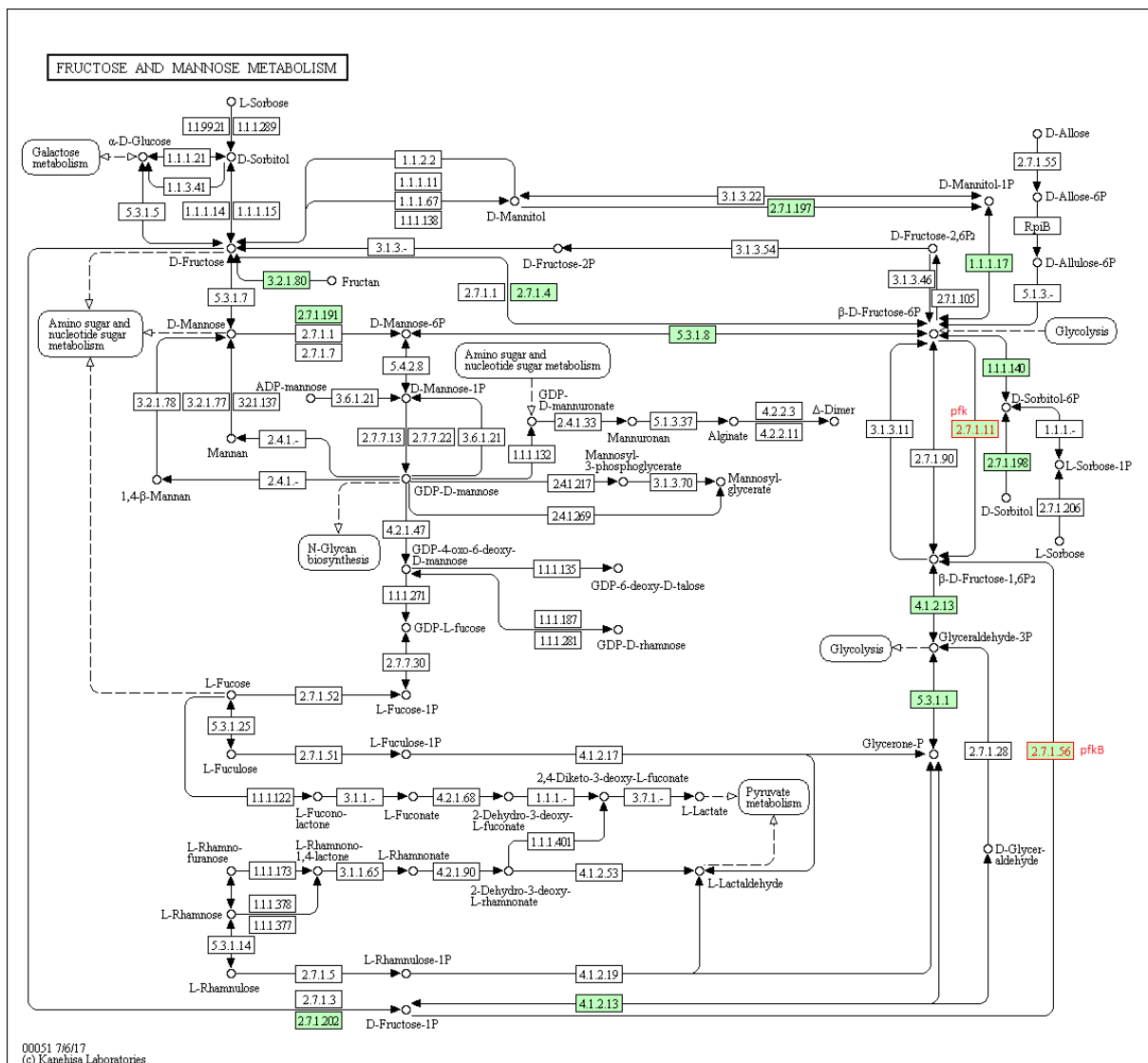


Figura 11.3. Rota metabólica dos genes *pfk* e *pfkB* obtida a partir da plataforma KEGG.

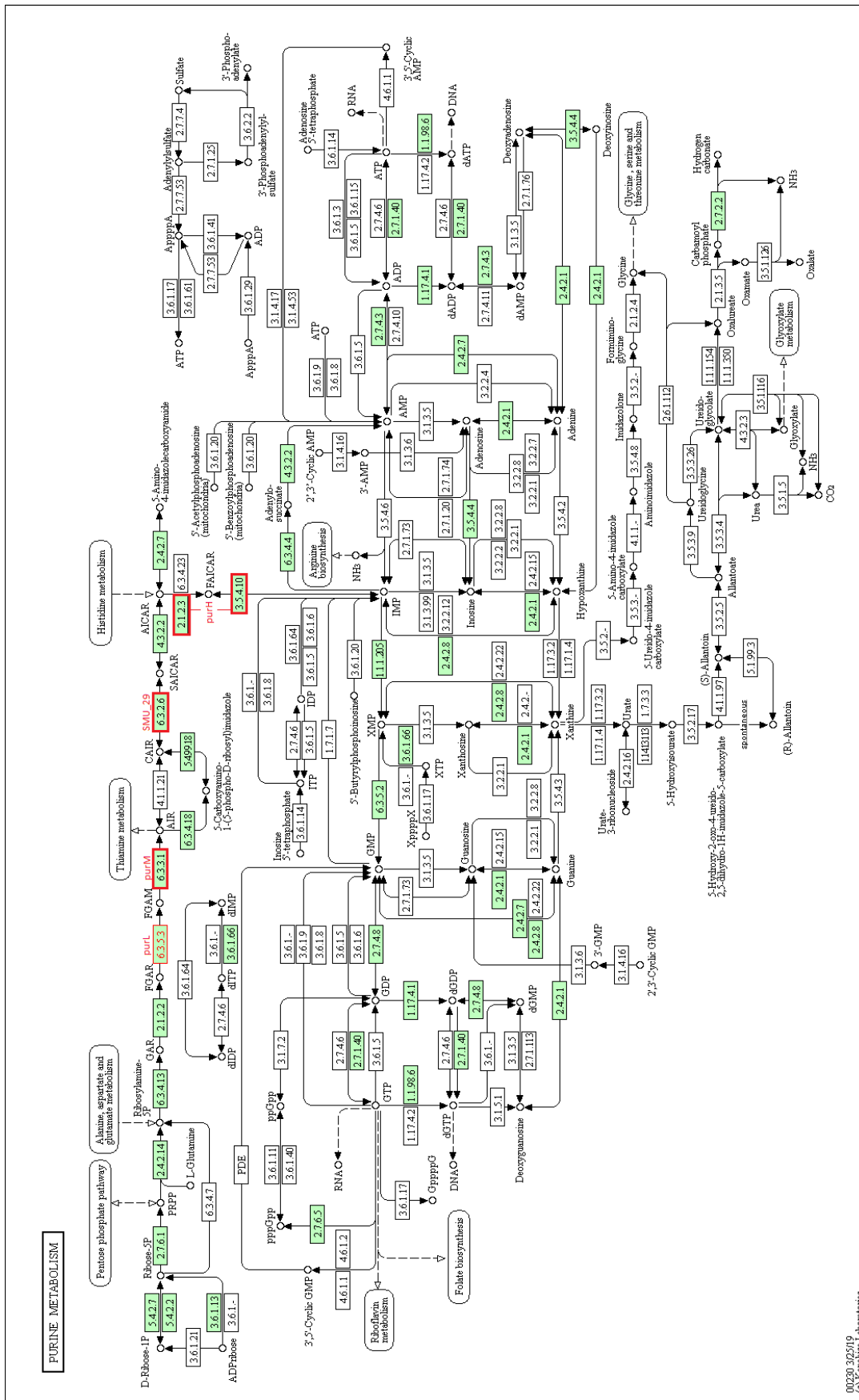


Figura 12.1. Rota metabólica dos genes *purL*, *purM* e *SMU_29* obtida a partir da plataforma KEGG.

00230_302519
(c) Kanehisa_Laboratories

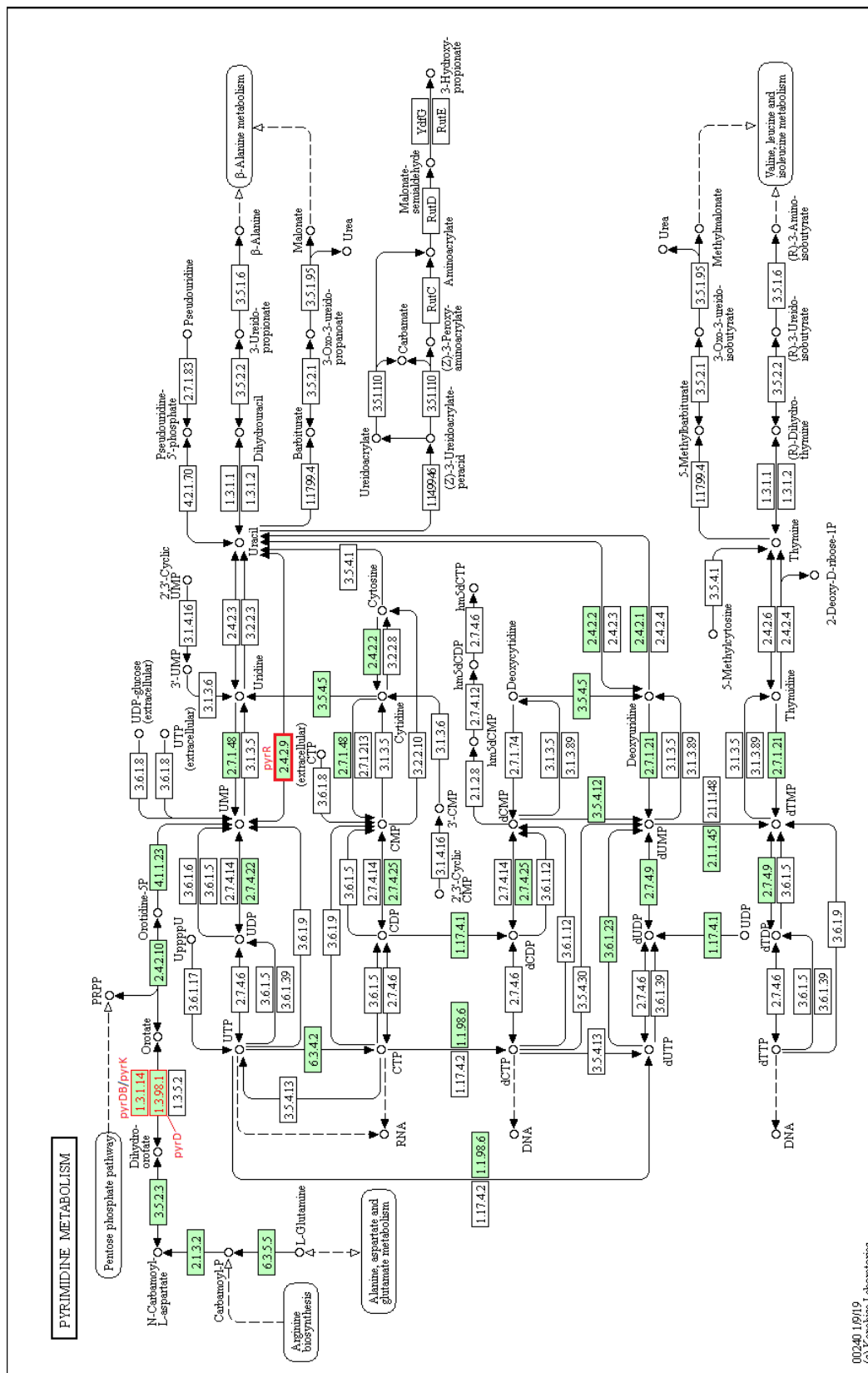


Figura 12.2. Rota metabólica dos genes *pyrDB*, *pyrK* e *pyrR* obtida a partir da plataforma KEGG.

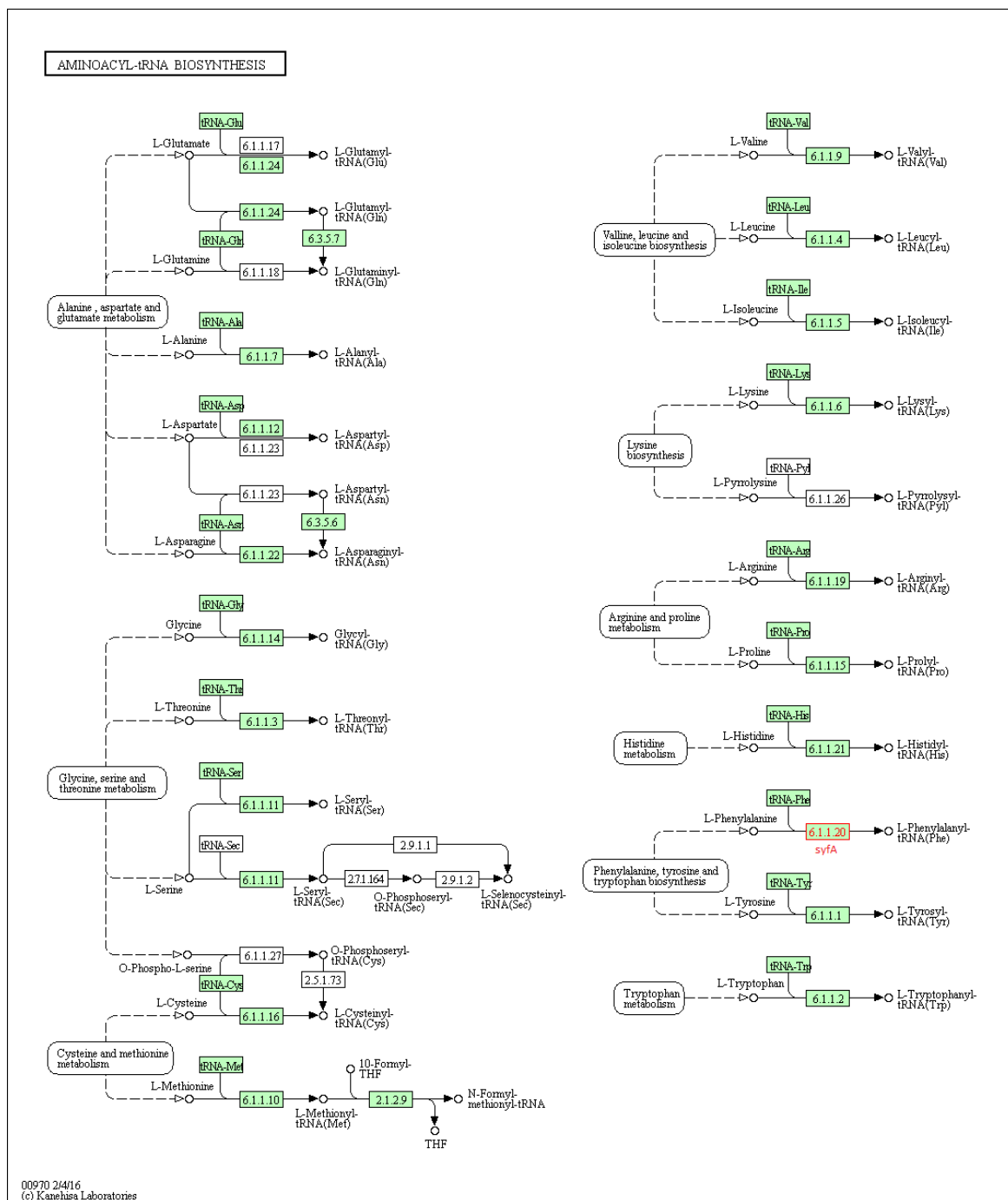


Figura 13. Rota metabólica do gene *syfA* obtida a partir da plataforma KEGG.

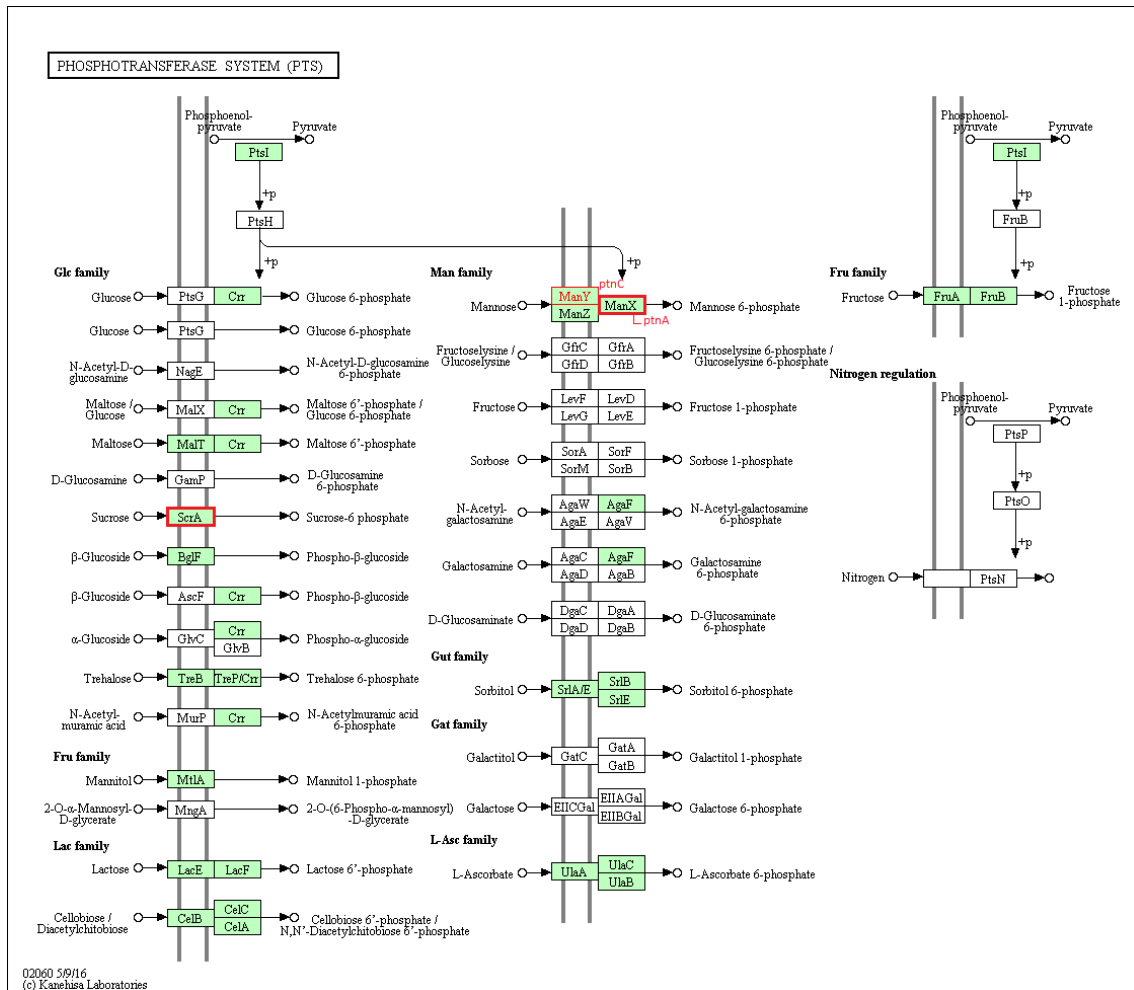


Figura 14. Rota metabólica dos genes *scrA*, *ptnC* e *ptnA* obtida a partir da plataforma KEGG.

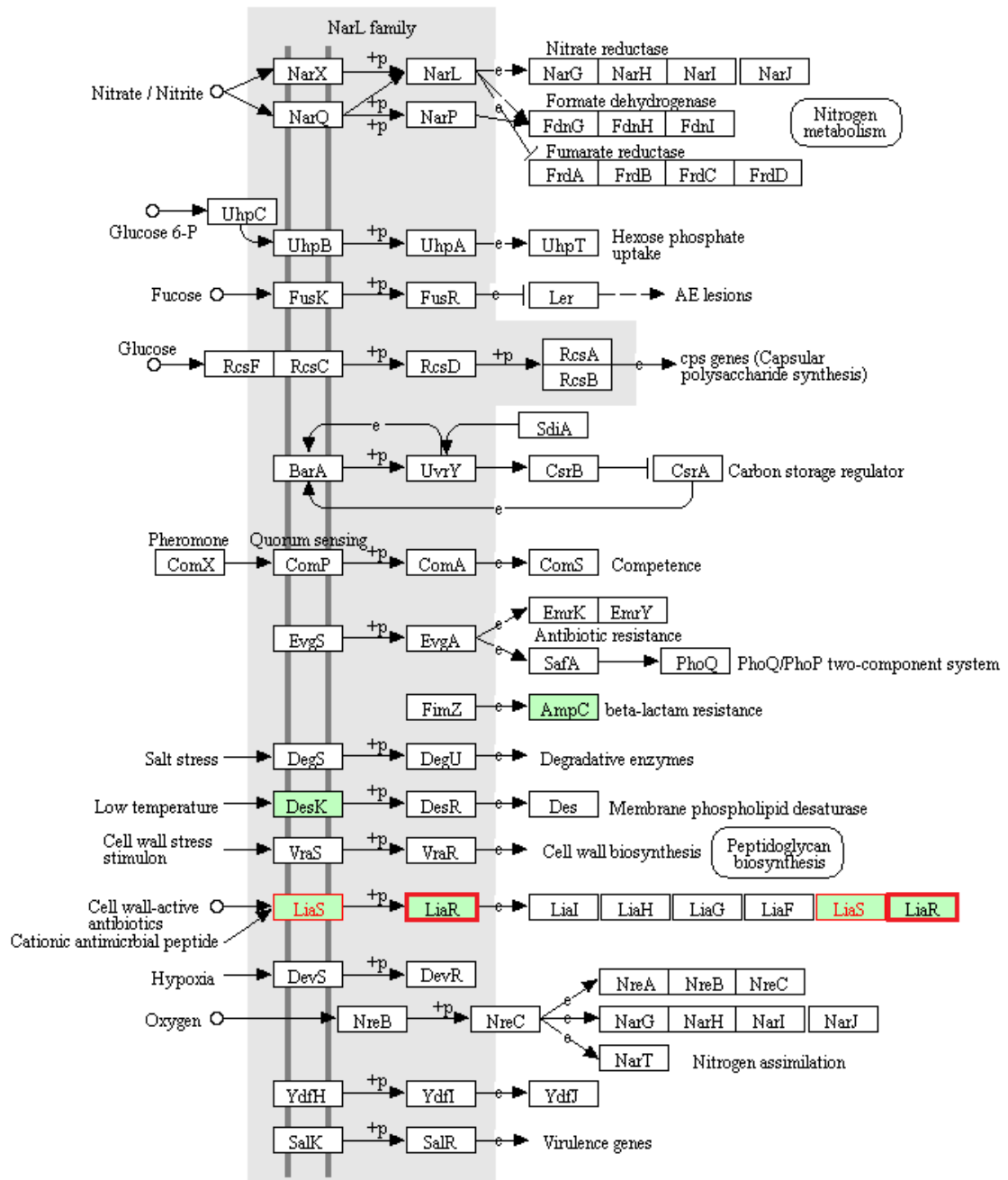


Figura 15. Rota metabólica dos genes *liaS* e *liaR* obtida a partir da plataforma KEGG.

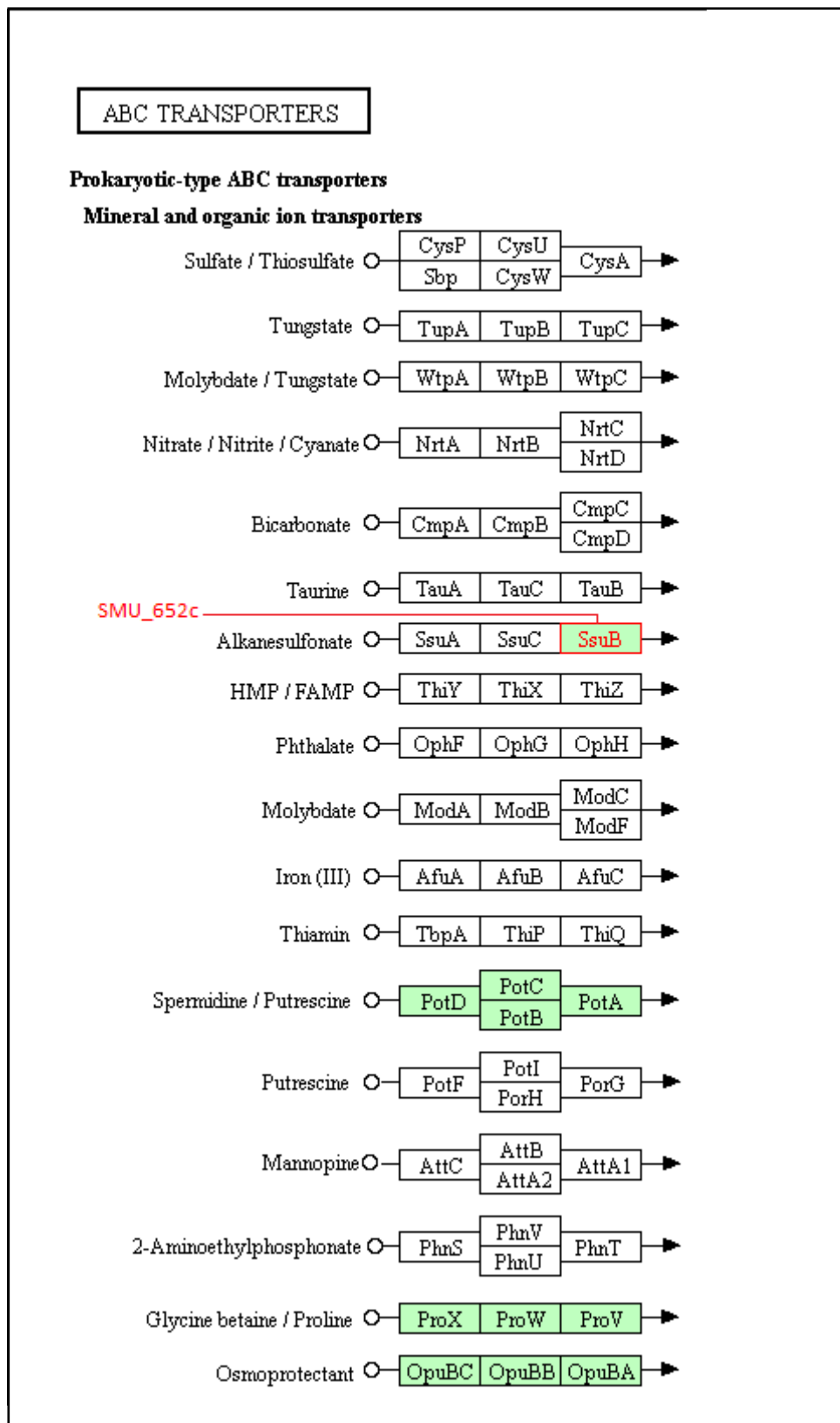


Figura 16. Rota metabólica do gene *SMU_652c* obtida a partir da plataforma KEGG.

5 DISCUSSÃO

Estudos *in vitro* que apresentavam como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados à tolerância ácida em *Streptococcus mutans* obtiveram como resultado que há uma maior expressão gênica dos genes relacionados a este mecanismo quando esta célula bacteriana cresce em um pH ácido. O pH baixo utilizado nestes estudos mimetiza o processo cariioso ativo, neste estágio da doença ocorre com bastante frequência quedas de pH em decorrência da excreção de ácidos oriundos do metabolismo do biofilme composto, em sua maioria, por microrganismos acidúricos e acidogênicos (Len *et al.*, 2004), (Gong *et al.*, 2009), (Baker *et al.*, 2015). No nosso estudo é possível inferir a partir da análise estatística que comparou a mediana do número de *reads* (dos 225 genes que estão relacionados aos mecanismos de tolerância ácida) do grupo superfície radiculares hígdas (SRS) e superfície radiculares cariadas (RC) que a mediana do grupo RC apresentou-se estatisticamente maior ($p < 0,001$). Este resultado apenas quantifica o número de *reads* de cada gene, mas já indica que há uma maior expressão gênica no grupo RC em relação ao grupo SRS, o que foi confirmado pela análise de expressão diferencial (Dseq).

Genes relacionados à via glicolítica e transporte de nutrientes:

Em relação às funções de Energia e metabolismo central, 6 genes apresentaram expressão diferencial (8,69% em relação em relação ao total). Analisando a rota metabólica é possível inferir que os genes *pfk* e *pfkB* participam da metabolização de açúcares e fazem parte do processo de glicólise (Sztajer *et al.*, 2008). O gene *eno* realiza a conversão de 2-fosfo-glicerato em fosfoenolpiruvato que é um precursor da síntese de piruvato que posteriormente pode ser convertido em ácido láctico. Porém, observamos que o gene *adhE* apresentou expressão diferencial realizando a conversão do 2-hidroxietyl-ThPP (produzido a partir do piruvato) em acetaldeído que posteriormente pode ser convertido em etanol. Nossa hipótese é que essa conversão tenha sido ativada como forma de se controlar a produção de ácidos pelo *S. mutans* num esforço para evitar uma intensa acidificação ambiental que pudesse comprometer sua viabilidade. Ainda, o gene *glgC* está associado à produção de uma enzima-chave que sintetiza glicogênio, que é um polissacarídeo intracelular (PIC) que tem papel importante na cariogenicidade do *S. mutans*. O PIC é uma reserva de carboidratos que pode ser utilizado para obtenção de

energia em períodos de jejum do hospedeiro que são caracterizados pelo período entre as refeições (Diez *et al.*, 2013), (Marsh *et al.*, 2018). A degradação do PIC também resultará em produção de ácidos que potencialmente podem desmineralizar as superfícies dentais. Além disso, observou-se que o gene *bglA*, que participa do transporte e subsequente utilização de carboidratos derivados de fontes vegetais, tais como salicina, arbutina, celobiose e aesculin (Cote *et al.*, 2003) também apresentou expressão diferencial, apesar de desconhecermos a contribuição da ativação desse transporte numa condição de estresse ácido compatível a um biofilme cariogênico.

Nesse sentido, é importante ressaltar que 3 genes relacionados ao sistema de fosfotransferase do açúcar bacteriano (PTS) apresentaram expressão diferencial (4,34% em relação ao total). O sistema PTS está envolvido no transporte de açúcares para o interior celular que serão utilizados para o metabolismo bacteriano (Lemos *et al.*, 2019). O gene *scrA* realiza a fosforilação dos substratos de açúcar recebidos e concomitantemente faz sua translocação dos compostos fosforilados através da membrana celular, estando principalmente envolvido no transporte de sacarose, convertendo a sacarose em sacarose-6-fosfato (Lemos *et al.*, 2019). Os genes *ptnA* e *ptnC*, estão relacionados ao metabolismo de açúcares, em específico, a manose, convertendo a manose em manose-6-fostato (Sztajer *et al.*, 2008), (Binopal *et al.*, 2017).

Genes relacionados à síntese de nucleotídeos e nucleosídeos:

A síntese de nucleotídeos e nucleosídeos apresentou 9 genes com expressão diferencial, perfazendo 13% em relação ao total (69 genes). De forma geral, a expressão diferencial desses genes indica a ocorrência de processos metabólicos básicos necessários para manutenção da viabilidade celular. Os genes *purL*, *purM*, *purH* e *SMU_29* participam do metabolismo de purinas. Hipotetiza-se que a síntese de adenina, um tipo de purina, está relacionada à geração de ATP que seria utilizado para extrusão de prótons (via mecanismo F-ATPase que será discutido mais adiante) (Baker *et al.*, 2017). Não foi encontrada a rota metabólica dos genes *SMU_991* e *SMU_2071*, mas acredita-se que eles participem deste mecanismo já que também apresentaram expressão diferencial. *pyrR*, após analisar sua rota metabólica, esse gene controla o operon *pyr* que participa da biossíntese de pirimidinas. Os genes *pyrD*, *pyrDB* e *pyrK* estão associados ao metabolismo de pirimidinas. Analisando a rota metabólica em que se encontra esses

genes, é possível inferir que os precursores para iniciar a rota metabólica deste grupo de nucleotídeos é a alanina, aspartato e glutamato, que são aminoácidos também relacionados à rota metabólica do gene *aguA* (presente no mecanismo de agmatina deiminase, que será discutido mais adiante) e aos genes *hisA*, *hisB* e *SMU_1961c* (relacionados a biossíntese de aminoácidos).

Genes relacionados à biossíntese de aminoácidos:

Ainda sobre o mecanismo de biossíntese de aminoácidos citado anteriormente, além dos genes *hisA*, *hisB* e *SMU_1961c*, o gene *ilvE* pertence a esta função e também apresentou expressão diferencial. Este gene específico participa da síntese de valina, leucina e isoleucina que são aminoácidos de cadeias ramificadas, este tipo de aminoácido leva a um redirecionamento do carbono que deixa de ser convertido em piruvato. Além disso, a reação realizada pelo *ilvE* produz amônia, que é uma molécula alcalina. (Baker *et al.*, 2017). A célula mutante para o gene *ilvE* apresenta crescimento deficiente, defeito na F₁F₀-ATPase (será discutida mais adiante) e ainda apresentava-se significativamente mais sensível à ácidos (Santiago *et al.*, 2012).

Esses mecanismos descritos acima (glicólise, biossíntese de aminoácidos e possíveis compostos alcalinos produzidos, bem como aumento na atividade do sistema PTS) podem sugerir que em ambientes acidificados, como nos biofilmes associados às lesões de cárie radicular, os microrganismos necessitam otimizar a captura de nutrientes para o meio intracelular e aproveitá-los com maior eficiência, o que pode ser observado pela maior expressão de genes da via glicolítica (como *pfk* e *pfkB*) e também pela maior atividade de genes relacionados à biossíntese de aminoácidos que por sua vez atuarão como precursores de moléculas maiores como polipeptídeos e proteínas. Ainda, é possível que em condições de baixa disponibilidade de nutrientes nos períodos de jejum do hospedeiro, é possível que os aminoácidos podem serem utilizados como substrato para síntese de glicose e consequente produção de energia. Compostos alcalinos que podem ser sintetizados a partir dos aminoácidos assim como produção de etanol e alterações da rota de produção do piruvato na via glicolítica podem atuar modulando a acidificação extracelular de forma a não comprometer a viabilidade microbiana.

Genes relacionados à função/biossíntese de peptidoglicano:

Dentre os 69 genes que apresentaram expressão diferencial, 17,4% (12 genes) estão relacionados com funções na membrana plasmática, os 12 genes deste mecanismo são: *spaP*, *mreC*, *mreD*, *murC2*, *pbp2a*, *dagk*, *SMU_911c*, *SMU_929c*, *SMU_1560*, *SMU_1646c*, *SMU_1701c* e *SMU_1807c*. O gene *spaP* produz uma adesina associada à parede celular que apresenta um importante papel na colonização quando a sacarose não está presente, ou seja, mesmo sem a presença de sacarose é possível produzir polímeros extracelulares que são imprescindíveis para adesão de bactérias à superfície do dente. Ainda neste contexto, pesquisas *in vitro* demonstraram que cepas mutantes do gene *spaP* não se aderiam ao esmalte dental (Crowley *et al.*, 1999). Os genes *mreC*, *mreD*, *murC2*, *pbp2a*, *dagK*, *SMU_911c*, *SMU_929c*, *SMU_1560*, *SMU_1646c* e *SMU_1807c* participam da regulação da forma celular e codificando componentes da parede celular. Esta função juntamente com gene *fabH*, que está relacionado ao mecanismo de biossíntese de ácidos graxos podem estar atuando concomitantemente para que alterações na membrana ocorram, possivelmente na tentativa de reduzir sua permeabilidade aos prótons e controlar/evitar a acidificação do citoplasma (Chattoraj *et al.*, 2010), (Park *et al.*, 2015), (Galvão *et al.*, 2015), (Uniprot). O gene *fabT* regula o operon *fab* que é responsável pela biossíntese de ácidos graxos insaturados de cadeia mais longa (Faustoferri *et al.*, 2015), O gene *SMU_1701c* codifica uma proteína associada à membrana que participa de mecanismos como autólise e lise celular em resposta às modificações que ocorrem no ambiente, como no caso de acidificação do pH do biofilme. Sabe-se que a morte celular programada é importante para eliminar células bacterianas danificadas pelo ambiente. A autólise de uma pequena subpopulação também libera DNA das bactérias danificadas que se liga a matriz extracelular, aumentando o biofilme (Kim *et al.*, 2019).

A bomba F₁-F₀ATPase que é composta por 8 genes (*atpA*, *atpB*, *atpC*, *atpD*, *atpE*, *atpF*, *atpG*, *atpH*) é descrita na literatura como um dos principais mecanismos para tolerância ácida em vários microrganismos, esta atua realizando a extrusão do próton H⁺ do interior celular e, como consequência positiva, ocorre uma alcalinização do citoplasma (Len *et al.*, 2004). Analisando o estudo de Baker *et al.*, 2015 onde em um dos seus grupos células foram cultivadas em um pH estacionário de 5,0, os achados deste grupo demonstram que 7 genes desta bomba apresentaram maior expressão nesta condição. Em nosso estudo apenas um gene que compõe essa bomba apresentou expressão diferencial,

o *atpH*. Este gene é a subunidade c (γ) da F-ATPase. O fato de termos encontrado expressão diferencial em apenas um deles reflete o momento da coleta da amostra, mas entende-se que todo o conjunto de genes relacionados á essa função pode estar sendo diferencialmente expresso, tanto é que todos os demais genes apresentaram reads nas condições avaliadas.

Os genes responsáveis pelo mecanismo de transporte e ligação representam 13% da amostra (9 genes de 69). Estes genes, como próprio nome sugere, atuam transportando as mais diversas moléculas para o interior ou para o exterior da célula bacteriana. O gene *SMU_653c* participa do transporte de proteínas através da membrana, o gene *SMU_652c* auxilia o transporte de nitratos, o gene *glpF* que codifica um transportador de glicerol, *nrgA* que codifica um transportador de amônia, *SMU_706c* que codifica uma proteína com atividade transportadora de tiamina, gene *SMU_459* que é responsável pelo responsável pelo transporte de aminoácidos, gene *SMU_602* responsável pelo transporte de sódio, gene *SMU_651c* responsável pelo transporte de nitrato/sulfonato/taurina e o gene *SMU_1897* que é responsável pela excreção de toxinas para meio extracelular. Entende-se, portanto, que codificação de proteínas de membrana que visam aumentar a adesão bacteriana ás superfícies, bem como viabilizar a formação de biofilmes, modificação na composição de lipídeos na membrana, aumento na atividade F-ATPase e de proteínas de membrana que controlam o influxo/efluxo de nutrientes e toxinas desempenham um importante papel no desenvolvimento dos biofilmes cariogênicos.

Genes relacionados à comunicação celular e resposta á fatores externos:

O Sistema de dois-componentes possui ao total 6 genes que apresentaram expressão diferencial (8,69% em relação ao total) (*comD/comE*, *liaS*, *liaR*, *levR* e *LevS*) apresentaram expressão diferencial. Este mecanismo permite que o *S. mutans* sinta as modificações que ocorrem no ambiente, e assim regule os fatores de transcrição para adaptar-se as novas condições ambientais (Gong *et al.*, 2009). Em relação a produção de toxinas, analisando a rota metabólica dos genes *SMU_1914c* e *SMU_423* que estão relacionados a este mecanismo, foi possível inferir pela análise da rota que para produção ocorrer era necessário a ativação dos genes *comD/comE* que participam do mecanismo do sistema de dois-componentes, onde o gene *comD* funciona como um sensor que permite a bactéria sentir as modificações que estão ocorrendo no ambiente e o gene *comE*

estimulará a atividade de fatores de transcrição para produção de toxinas (mutacinas) (Xie *et al.*, 2010). As mutacinas secretadas por *S. mutans* são antibióticos usados na defesa contra outros micróbios orais, fornecendo assim uma vantagem para *S. mutans*, pois estas suprimem o crescimento de outras bactérias concorrentes presentes no biofilme dental (Zhang *et al.*, 2009), (Lemos *et al.*, 2019). Além disso, O gene *liaS* parece regular a expressão e secreção de mutacina. Os genes *liaS* e *liaR* estão envolvidos com formação de biofilme, uma vez que bactérias deficientes nesse gene apresentaram capacidade reduzida de formarem biofilmes (Suntharalingam *et al.*, 2009), (Zhang *et al.*, 2009). O gene *liaS* está também associado á aciduricidade já que mutações nesse gene resultam em reduzida tolerância ácida (Zhang *et al.*, 2009).

O gene *luxS* é responsável por sintetizar um sinal celular (*quorum sensing*) universalmente reconhecido como autoindutor-2 (AI-2), este sinal pode ser um fator importante na regulação da expressão gênica relacionada ao biofilme, podendo modular a utilização de energia para o crescimento em um ambiente competitivo. As bactérias que apresenta mutação nesse gene apresentam deficiência na formação de biofilme (Merritt *et al.*, 2003), (Wen e Burne, 2004). Analisando a rota metabólica desse gene foi possível inferir que ele estava ligado ao metabolismo da cisteína, transformando um intermediário tóxico S-D-Ribosil-L-homocisteína em homocisteína, esta reação fornece grupos metila para RNA, DNA e proteínas (Sztajer *et al.*, 2008). Portanto, em resposta ao ambiente acidificado dos biofilmes, os *S. mutans* desencadeiam respostas que viabilizam formação de biofilme e síntese de mutacinas.

Genes relacionados ao controle do pH intracelular:

O sistema agmatina deiminase possui 2 genes que apresentaram expressão diferencial (2,89% em relação ao total). Os genes *otcA* e *aguA* convertem agmatina em amônia, CO₂, putrescina e ATP, a amônia gerada pode contribuir para a neutralização do pH citoplasmático, enquanto o ATP gerado pode ser usado para alimentar a extrusão de prótons através da bomba F₁-F₀-ATPase que já foi discutida anteriormente (Lemos *et al.*, 2019). Como já descrito acima, e apesar dos *S. mutans* serem altamente ácido-tolerantes, entende-se que esse mecanismo é um importante fator de controle de acidificação que impede que o pH no meio intracelular seja reduzido à valores que inviabilizem o crescimento dos *S. mutans*.

Genes relacionados à mecanismos de reparos á macromoléculas:

O gene *end3 (smn)* foi o único que apresentou expressão diferencial em relação ao mecanismo de reparação de DNA (1,44% em relação ao total). A literatura relata que o reparo de DNA é um mecanismo importante para proteção contra flutuações de pH, este reparo ocorre por meio da excisão de base de DNA e tem um papel importante na manutenção do genoma, impedindo o acúmulo de mutações e protegendo a célula contra efeitos de lesões altamente mutagênicas. Cepas mutantes para o gene *smn* apresentam frequências de mutação espontânea elevadas (Gonzalez *et al.*, 2012).

Genes relacionados à demais funções:

Outros mecanismos que apresentaram somente um gene com expressão diferencial foram: replicação e divisão celular com gene *greA* (1,44% em relação ao total), estresse oxidativo com gene *tpx* (1,44% em relação ao total), reparo de proteínas e degradação com gene SMU_143c (1,44% em relação ao total) e genes envolvidos na tradução (1,44% em relação ao total).

Após a discussão da importância de determinados genes para fisiologia e adaptação dos *S. mutans* em biofilme cariogênicos, cabe ressaltar que a maioria dos estudos realizados com intuito de descrever as modificações gênicas em *S. mutans* quando em um ambiente ácido são estudos *in vitro* (Len *et al.*, 2004), (Gong *et al.*, 2009), (Baker *et al.*, 2015). Porém, estes estudos são realizados em um ambiente controlado e com bactéria na sua forma planctônica, o que de alguma forma limita os achados, pois o biofilme da cavidade oral possui uma variedade enorme de microrganismos em constante interação, o que pode modular a expressão gênica. Apesar das rotas descritas acima possuem genes mais expressos em condição de doença (cárie radicular), ainda existem dúvidas sobre a real contribuição de determinados genes na patogênese da cárie radicular. Baker *et al.* (2017) discutem que ainda não se pode afirmar se sistema agmatina deiminase é importante clinicamente (Baker *et al.*, 2017). O fato dos nossos resultados mostrarem uma maior expressão de genes desse sistema sugerem que em condições clínicas de biofilmes polimicrobianos a atuação desse sistema é fundamental para manutenção da viabilidade celular. Em acréscimo, os mesmos autores (Baker *et al.*, 2017) questionam como a produção de ácidos graxos é iniciada para modificar a permeabilidade da membrana. Em nosso estudo, o gene *fabH* apresentou expressão diferencial e este catalisa

a primeira reação de condensação que inicia a síntese de ácidos graxos, elucidando em partes as dúvidas do autor. Ainda, questionou-se qual seria a real contribuição do gene *ivlE* em ambientes ácidos. Nossos resultados também sugerem a importância da rota regulada por esse gene na tolerância ácida.

Ressaltamos que os resultados do presente estudo são provenientes de RNA de amostras clínicas. Esses resultados confirmam alguns achados *in vitro* anteriormente relatados, porém trazem novas evidências sobre genes que potencialmente estão envolvidos nos mecanismos de tolerância ácida. Além disso, as amostras correspondem à biofilme polimicrobiano, de forma que a expressão diferencial encontrada pode ser resultado da interação microbiana existente nesse ambiente microbiologicamente complexo. Dessa forma, o nível de evidência dos resultados apresentados é elevado por se tratar de um estudo clínico realizado sob condições reais utilizando ferramentas de biologia molecular para esclarecimento do processo saúde-doença.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que existe expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância ácida de *S. mutans* em biofilme cariogênico. Genes diferencialmente expressos em condição de cárie radicular estão associados á rotas metabólicas e funções de formação de biofilme, sistema agmatina deiminase, produção ou resistência á toxinas, reparação de DNA, biossíntese de ácidos graxos, replicação e divisão celular, biossíntese de aminoácidos, atividade de membrana, estresse oxidativo, energia e metabolismo central, proteína de reparo e degradação, síntese de nucleotídeos e nucleosídeos, codificação de fatores de transcrição, sistema fosfotransferase do açúcar, sistema de dois componentes, transporte e ligação e extrusão de prótons. Hipotetizamos que esses genes diferencialmente expressos podem futuramente ser utilizados como marcadores de virulência de biofilme cariogênico.

7 REFERÊNCIAS

- 1- Arthur RA, Martins VB, de Oliveira CL, Leitune VC, Collares FM, Magalhães AC, Maltz M. Effect of over-the-counter fluoridated products regimens on root caries inhibition. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(10):1588-1594.
- 2- Asención Díez MD, Demonte AM, Guerrero SA, Ballicora MA, Iglesias AA. The ADP-glucose pyrophosphorylase from *Streptococcus mutans* provides evidence for the regulation of polysaccharide biosynthesis in Firmicutes. *Mol Microbiol.* 2013; 90(5):1011-1027.
- 3- Baker JL, Abranches J, Faustoferri RC, Hubbard CJ, Lemos JA, Courtney MA, Quivey R Jr. Transcriptional profile of glucose-shocked and acid-adapted strains of *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol.* 2015; 30(6):496-517.
- 4- Baker JL, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*-the more we know, the more we don't. *Mol Oral Microbiol.* 2017; 32(2):107-117.
- 5- Beck J. The epidemiology of root surface caries. *J Dent Res.* 1990; 69(5):1216-1221.
- 6- Binopal G, Wenderska IB, Crowley P, Besingi RN, Senadheera DB, Jeannine Brady L, Cvitkovitch DG. K⁺ modulates genetic competence and the stress regulon of *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2017; 163(5):719-730.
- 7- Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities *in vitro*. *J Dent Res.* 1989; 68(9):1298-1302.
- 8- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- 9- Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *J Bacteriol.* 2010; 192(9):2445-2458.
- 10- Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004;42(7):3128-3136.

- 11- Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, Monteiro DR, Botazzo Delbem AC. pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions *in vitro*. Arch Oral Biol. 2018; 90:9-12.
- 12- Chi DL, Berg JH, Kim AS, Scott J, Northwest Practice-based REsearch Collaborative in Evidence-based DENTistry. Correlates of root caries experience in middle-aged and older adults in the Northwest Practice-based REsearch Collaborative in Evidence-based DENTistry research network. J Am Dent Assoc. 2013; 144(5):507-516.
- 13- Clarke JK. On the Bacterial Factor in the Ætiology of Dental Caries. Br J Exp Pathol. 1924;5(3):141–147.
- 14- Chatteraj P, Banerjee A, Biswas S, Biswas I. ClpP of *Streptococcus mutans* differentially regulates expression of genomic islands, mutacin production, and antibiotic tolerance. J Bacteriol. 2010; 192(5):1312-1323.
- 15- Christensen LB, Bardow A, Ekstrand K, Fiehn NE, Heitmann BL, Qvist V, Twetman S. Root caries, root surface restorations and lifestyle factors in adult Danes. Acta Odontol Scand. 2015;73(6):467-473.
- 16- Cote CK, Honeyman AL. The LicT protein acts as both a positive and a negative regulator of loci within the bgl regulon of *Streptococcus mutans*. Microbiology. 2003; 149(Pt 5):1333-1340.
- 17- Crowley PJ, Brady LJ, Michalek SM, Bleiweis AS. Virulence of a *spaP* mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. Infect Immun. 1999; 67(3):1201-1206.
- 18- Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Specificities of Caries on Root Surface. Monogr Oral Sci. 2017; 26:15-25.
- 19- Damé-Teixeira N, Parolo CC, Maltz M, Tugnait A, Devine D, Do T: *Actinomyces* spp. gene expression in root caries lesions. J Oral Microbiol 2016;6(8):32383.
- 20- Damé-Teixeira N, Parolo CC, Maltz M, Rup AG, Devine D, Do T. Gene expression of bacterial collagenolytic proteases in root caries. J Oral Microbiol. 2018; 10, 1424475.
- 21- Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid?. J Can Dent Assoc. 2003; 69(11):722-724.
- 22- Delgado AJ, Olafsson VG. Acidic oral moisturizers with pH below 6.7 may be harmful to teeth depending on formulation: a short report. Clin Cosmet Investig Dent. 2017; 3(9):81-83.

- 23- Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019; 23(1):122-128.
- 24- Do T, Damé-Teixeira N, Naginyte M, Marsh PD. Root Surface Biofilms and caries. *Monogr Oral Sci.* 2017; 26:26-34.
- 25- Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61:9-19.
- 26- Fozo EM, Kajfasz JK, Quivey RG Jr. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 15;238(2):291-295.
- 27- Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Laverty D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol.* 2017; 44.
- 28- Galvão LC, Miller JH, Kajfasz JK, Scott-Anne K, Freires IA, Franco GC, Abranches J, Rosalen PL, Lemos JA. Transcriptional and Phenotypic Characterization of Novel Spx-Regulated Genes in *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 2015. 23;10(4):e0124969.
- 29- García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc.* 2008 May;139 Suppl:25S-34S.
- 30- Gong Y, Tian XL, Sutherland T, Sisson G, Mai J, Ling J, Li YH. Global transcriptional analysis of acid-inducible genes in *Streptococcus mutans*: multiple two-component systems involved in acid adaptation. *Microbiology.* 2009; 155:3322-3332.
- 31- Gonzalez K, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. Role of DNA base excision repair in the mutability and virulence of *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol.* 2012; 85(2):361-377.
- 32- Griswold AR, Jameson-Lee M, Burne RA. Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 2006;188(3):834-841.
- 33- Griswold AR, Chen YY, Burne RA. Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 2004; 186(6):1902-1904.
- 34- Hanna et al., *uvrA* Is an Acid-Inducible Gene Involved in the Adaptive Response to Low pH in *Streptococcus mutans*. 2001;183(20):5964-73.

- 35- Hayes M, Da Mata C, Cole M, McKenna G, Burke F, Allen PF. Risk indicators associated with root caries in independently living older adults. *J Dent*. 2016 Aug; 51:8-14.
- 36- Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, Takahashi N. Transient acid-impairment of growth ability of oral *Streptococcus*, *Actinomyces*, and *Lactobacillus*: a possible ecological determinant in dental plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Aug;24(4):319-24.
- 37- Izquierdo, CM. Cárie coronária e radicular em adultos e idosos de Porto Alegre: estudo de coorte prospectivo de 4 anos. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica: Cariologia/Dentística) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2018.
- 38- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global Burden of Untreated Caries: A Systematic Review and Metaregression *J Dent Res*. 2015; 94(5):650-658.
- 39- Keyes PH. Research in dental caries. *J Am Dent Assoc*. 1968; 76(6):1357-1373.
- 40- Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*. 2004;83 Spec No C:C35-8.
- 41- Kim HM, Waters A, Turner ME, Rice KC, Ahn SJ. Regulation of cid and lrg expression by CcpA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2019; 165(1):113-123.
- 42- Kovacs CJ, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. RgpF Is Required for Maintenance of Stress Tolerance and Virulence in *Streptococcus mutans*. 2017; 14;199(24).
- 43- Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol*. 2005; 7(1):95-107.
- 44- Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2008; 154(Pt 11):3247-55.
- 45- Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019 Jan;7(1).
- 46- Len AC, Harty DW, Jacques NA. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology*. 2004; 150:1339-51.
- 47- Liu C, Niu Y, Zhou X, Zheng X, Wang S, Guo Q, Li Y, Li M, Li J, Yang Y, Ding Y, Lamont RJ, Xu X. *Streptococcus mutans* copes with heat stress by multiple

- transcriptional regulons modulating virulence and energy metabolism. *Sci Rep.* 2015; 5:12929.
- 48- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
- 49- Marques RAA, Antunes JLF, Sousa MLR, Peres MA, Frazao P. Root caries prevalence and severity in Brazilian adults and older people. *Rev Saúde Pública.* 2013; 47(3):1-9.
- 50- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology.* 2003 Feb;149(Pt 2):279-94.
- 51- Marsh PD. In *Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective.* *Adv Dent Res.* 2018; 29(1):60-65.
- 52- Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017 Mar;44 Suppl 18:S12-S22.
- 53- Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W. Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2003; 71(4):1972-9.
- 54- Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009 Apr;19(4):636-43.
- 55- Nyvad B, Fejerskov O: Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications. *Int Dent J* 1982; 32:312-26.
- 56- Park SN, Ahn SJ, Kook JK. Oleanolic acid and ursolic acid inhibit peptidoglycan biosynthesis in *Streptococcus mutans* UA159. *Braz. J. Microbiol.* 2015; 46 (2): 613-617.
- 57- Pentapati KC, Siddiq H, Yeturu SK. Global and regional estimates of the prevalence of root caries - Systematic review and meta-analysis. *Saudi Dent J.* 2019 Jan;31(1):3-15.
- 58- Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 25(3):17030.
- 59- Rios FS, Costa RS, Moura MS, Jardim JJ, Maltz M, Haas AN. Estimates and multivariable risk assessment of gingival recession in the population of adults from Porto Alegre, Brazil. *J Clin Periodontol.* 2014; 41(11):1098-1107.
- 60- Ritter AV, Shugars DA, Bader JD. Root caries risk indicators: a systematic review of risk models. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010; 38(5):383-397.

- 61- Rosen S, Lenney WS, O'Malley JE. Dental caries in gnotobiotic rats inoculated with *Lactobacillus casei*. *J Dent Res*. 1968 May-Jun;47(3):358-63.
- 62- Santiago B, MacGilvray M, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. The branched-chain amino acid aminotransferase encoded by *ilvE* is involved in acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2012;194(8):2010-9.
- 63- Serrano C, Suarez E, Uzaheta A. Prevalence and Extent of Gingival Recession in a National Sample of Colombian Adults. *International Academy of Periodontology*. 2018; 20(3): 94–101.
- 64- Silva M, Hopcraft M, Morgan M. Dental caries in Victorian nursing homes. *Aust Dent J*. 2014; 59(3):321-328.
- 65- Simark-Mattsson C, Emilson CG, Håkansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. *Lactobacillus*-mediated interference of *mutans streptococci* in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(4):308-314.
- 66- Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res*. 2015; 94(10):1341-7.
- 67- Struzycka I. The Oral Microbiome in Dental Caries. *Pol J Microbiol*. 2014;63(2):127-135.
- 68- Suntharalingam P, Senadheera MD, Mair RW, Lévesque CM, Cvitkovitch DG. The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2009; 191(9):2973-2984.
- 69- Sztajer H, Lemme A, Vilchez R, Schulz S, Geffers R, Yip CY, Levesque CM, Cvitkovitch DG, Wagner-Döbler I. Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the *luxS* mutation. *J Bacteriol*. 2008; 190(1):401-415.
- 70- Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*. 2005; 103-112.
- 71- Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008;42(6):409-418.
- 72- Takahashi N, Nyvad B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res*. 2016;50(4):422-431.
- 73- Tan HP, Lo EC. Risk indicators for root caries in institutionalized elders. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2014; 42(5):435-440.

- 74- Tan H, Richards L, Walsh T, Worthington HV, Clarkson JE, Wang L, Mattar de Amoedo Campos Velo M. Interventions for managing root caries. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2017; DOI: 10.1002/14651858.CD012750.
- 75- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 69(1):137-143.
- 76- Wen ZT, Burne RA. LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *J Bacteriol.* 2004; 186(9):2682-2691.
- 77- Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J Dent Res.* 2015; 94(2):261-271.
- 78- Xie Z, Okinaga T, Niu G, Qi F, Merritt J. Identification of a novel bacteriocin regulatory system in *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol.* 2010; 78(6):1431-1447.
- 79- Youngs G. Risk factors for and the prevention of root caries in older adults. *Spec Care Dentist.* 1994;14(2):68-70.
- 80- Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis.* 2012; 18(2):109-120.
- 81- Zhang J, Biswas I. A phenotypic microarray analysis of a *Streptococcus mutans liaS* mutante. *Microbiology.* 2009; 155(Pt 1):61-68.