

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA

AMANDA RENOSTRO SOUZA

ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MUTANTES MORFOLÓGICOS DE
Streptococcus mutans

UBERABA – MG

2024

AMANDA RENOSTRO SOUZA

ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MUTANTES MORFOLÓGICOS DE
Streptococcus mutans

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração Biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Jr.

UBERABA – MG
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

S89a Souza, Amanda Renostro.
Análise bioquímica de mutantes morfológicos de *Streptococcus mutans* / Amanda Renostro Souza. – Uberaba, 2024.
44 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Jr.

1. Odontologia. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Biofilme. I. Thedei Jr., Geraldo. II. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Biopatologia. III. Título.

CDD 617.6

AMANDA RENOSTRO SOUZA

ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MUTANTES MORFOLÓGICOS DE STREPTOCOCCUS
MUTANS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

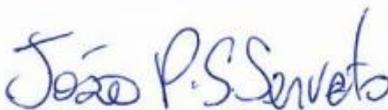
Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 27/02/2024

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior
Orientador
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. João Paulo Silva Servato
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Izabel e Robson, por todo apoio, confiança e incentivo depositados em mim e ao Léo, que nunca me deixou desistir.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Geraldo Thedei Jr. pela orientação, paciência e por todos os conhecimentos adquiridos.

A Otília Cristina Rodrigues Brandão, por toda atenção, apoio e confiança.

A Larissa Aguiar Bisinoto, pela paciência e atenção que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini e Rodrigo Ferreira Silva, da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto, pela atenção e disponibilização do Microscópio Eletrônico de Varredura, que possibilitou a análise morfológica dos biofilmes de *S. mutans*.

A Prof.^a Dra. Flávia de Souza Lima, do IFTM, pela disponibilidade e orientação quanto a utilização do microscópio Dino-Lite, para a análise morfológica das colônias de *S. mutans*.

A Prof. Dra. Giuliana Cristina Marre Bruschi Thedei pela orientação nas análises genéticas das linhagens ATCC e mutantes de *S. mutans*.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

RESUMO

A cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa e dieta-dependente, que se apresenta como um importante problema de saúde pública em todo o mundo. A bactéria gram positiva *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é o agente etiológico mais importante no desenvolvimento da cárie e tem como uma das suas principais propriedades de virulência a capacidade de formar biofilmes. As glicosiltransferases (GTFs), enzimas responsáveis por essa propriedade, convertendo açúcares em glucanos adesivos, resultando na formação do biofilme. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a caracterização de linhagens mutantes com capacidade reduzida de formação de biofilme. Para isso, foram isoladas duas linhagens de *S. mutans* com morfologia alterada, as quais foram identificadas bioquímica e geneticamente como *S. mutans*. Em seguida, os mutantes foram caracterizados quanto a atividade metabólica, adesividade, morfologia da colônia, estrutura do biofilme e atividade das enzimas Glicosiltransferase B e Glicosiltransferase C, em comparação com a linhagem selvagem. Os dados obtidos nos permitem concluir que as linhagens mutantes com morfologia alterada apresentam metabolismo energético, atividade GTF B e C e morfologia celular inalterados em relação ao padrão da linhagem ATCC, mas tem seu mecanismo de formação de biofilme alterado, de modo a formar menos biofilme em meios suplementados com sacarose como fonte de carbono.

Palavras-Chave: *Streptococcus mutans*; Glicosiltransferases; Biofilme.

ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial, infectious and diet-dependent disease, which represents an important public health problem worldwide. The gram-positive bacterium *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is the most important etiological agent in the development of caries and one of its main virulence properties is the ability to form biofilms. Glycosyltransferases (GTFs), enzymes responsible for this property, convert sugars into glucan patches, resulting in biofilm formation. The objective of this work is the isolation and characterization of mutant strains with reduced biofilm formation capacity. For this, two strains of *S. mutans* with altered morphology were isolated, which were biochemically and genetically identified as *S. mutans*. Then, the mutants were characterized regarding metabolic activity, adhesiveness, colony morphology, biofilm structure and activity of the enzymes Glycosyltransferase B and Glycosyltransferase C, in comparison with the wild-type strain. The data obtained allow us to conclude that the mutant strains with altered morphology present unchanged energy metabolism and cellular morphology in relation to the ATCC strain pattern, but their biofilm formation mechanism is altered, as to form less biofilm in media supplemented with sucrose as a carbon source.

Key words: *Streptococcus mutans*; Glucosyltransferases; Biofilms

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Crescimento de *S. mutans* em meio completo sólido. Linhagem ATCC 25175 em glicose (A) e sacarose (B); linhagem mutante 4.4 em glicose (C) e em sacarose (D); linhagem mutante 5.1 em glicose (E), e em sacarose (F). Aumento de 40x.....17
- Figura 2** – Microscopia eletrônica de varredura das linhagens de *S. mutans*. Linhagem ATCC 25175 após crescimento em meio completo com glicose (A) e sacarose (B), linhagem mutante 4.4 em glicose (C) e sacarose (D), linhagem mutante 5.1 em glicose (E) e sacarose (F). Aumento de 300x.19
- Figura 3** – Microscopia eletrônica de varredura das linhagens de *S. mutans*. Linhagem ATCC 25175 após crescimento em meio completo com glicose (A) e sacarose (B), linhagem mutante 4.4 em glicose (C) e sacarose (D), linhagem mutante 5.1 em glicose (E) e sacarose (F). Aumento de 10.000x.....20
- Figura 4** - Coloração com cristal violeta referente ao crescimento de ATCC em glicose e sacarose.....26
- Figura 5** - Coloração com cristal violeta referente ao crescimento de 4.4 em glicose e sacarose.....27
- Figura 6** - Coloração com cristal violeta referente ao crescimento de 5.1 em glicose e sacarose.....28
- Figura 7** – Padrão de atividade da enzima Glicosiltransferase após eletroforese em gel de poliacrilamida. Da esquerda para a direita, apresenta-se as linhagens ATCC em glicose, ATCC em sacarose, 4,4 em glicose, 4,4 em sacarose, 5,1 em glicose e 5,1 em sacarose. Gel corado com a técnica do Ácido Periódico de Schiff, após a incubação em sacarose.....29
- Figura 8** – Ausência do padrão de atividade após eletroforese em gel de poliacrilamida corado imediatamente após a corrida com a técnica do Ácido Periódico de Schiff.....30
- Figura 9** – Padrão eletroforético após coloração com Comassie Blue. Da esquerda para a direita, apresenta-se as linhagens ATCC em glicose, ATCC em sacarose, 4,4 em glicose, 4,4 em sacarose, 5,1 em glicose e 5,1 em sacarose.....30
- Figura 10** – Eletroforese das amostras de DNA extraídos das linhagens ATCC 25175 e mutantes 4.4 e 5.1. No gel: 1 e 2 = selvagem; 3 e 4 = mutante 4.4; 5 e 6 = mutante 5.1.....32
- Figura 11** – Eletroforese das reações de PCR realizadas com as linhagens selvagem e mutantes 4.4 e 5.1 para amplificação dos genes *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *ftf*, *VicX* e *VicR*.....32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Leitura de pH das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5,1 (▲) em meio suplementado com glicose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação *múltipla* por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn.....22

Gráfico 2 - Leitura de pH das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5,1 (▲) em meio suplementado com sacarose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação *múltipla* por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn.....23

Gráfico 3 - Absorbância em 620nm das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5,1 (▲) em meio completo com glicose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação *múltipla* por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn.....24

Gráfico 4 - Absorbância em 620nm das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5,1 (▲) em meio completo com sacarose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação *múltipla* por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn.....24

Gráfico 5 - Absorbância em 550nm das cepas ATCC (●), 4,4 (■) e 5,1 (▲) em meio completo com glicose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação *múltipla* por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn.....25

Gráfico 6 - Absorbância em 550nm das cepas ATCC (●), 4,4 (■) e 5,1 (▲) em meio completo com sacarose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação *múltipla* por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn.....26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Primers utilizados e suas respectivas sequências.....	15
Quadro 2 – Contagem de colônias crescidas em meio completo sólido e sacarose.....	16
Quadro 3 – Resultados da análise bioquímica das linhagens estudadas.....	21
Quadro 4 – Quantificação das bandas de atividade através de densitometria de imagem do gel de eletroforese corado com a técnica do Ácido Periódico de Schiff.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 A CÁRIE DENTÁRIA	2
1.2 <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	3
1.3 GLICOSILTRANSFERASE E BIOFILME.....	5
2. OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	8
3. METODOLOGIA	9
3.1 LINHAGEM DE <i>S. MUTANS</i>	9
3.2 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>S. MUTANS</i>	9
3.3 SOLUÇÕES.....	9
3.4 GEL DE ELETROFORESE:	10
3.5 MEIOS DE CULTIVO.....	10
3.6 ISOLAMENTO DAS LINHAGENS MUTANTES	11
3.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA:	11
3.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV):	11
3.9 ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS LINHAGENS MUTANTES	12
3.10 CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO E ACIDIFICAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES	13
3.11 CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA:	13
3.12 PREPARAÇÃO DE DNA:	14
3.13 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE:	15
3.14 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR):.....	15
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA:	16
4. RESULTADOS	17
4.1 ISOLAMENTO DAS LINHAGENS MUTANTES	17
4.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA	17
4.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)	18
4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS LINHAGENS MUTANTES	21
4.5 CURVA DE CRESCIMENTO	21
4.6 CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA:.....	29
4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES POR PCR.....	32
5. DISCUSSÃO	34
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 A cárie dentária

A cárie dentária é uma das doenças humanas mais prevalentes em todas as faixas etárias. Estima-se que mais de 90% da população mundial terá pelo menos um episódio de cárie dentária ao longo da vida (PETERSEN; KWAN, 2009). Se não tratada, a cárie dentária pode levar a dor, infecção da polpa dentária e até mesmo perda do dente, e o impacto da saúde bucal na saúde geral tem despertado grande preocupação (SÖDER *et al.*, 2012). A cárie dentária surge a partir de biofilmes crônicos que contêm microrganismos cariogênicos que degradam carboidratos fermentáveis (principalmente sacarose) em ácidos orgânicos que causam desmineralização e destruição do tecido dental (CUI *et al.*, 2019; CAUFIELD; GRIFFEN, 2000). É uma doença crônica que progride lentamente na maioria dos indivíduos e, inicialmente, é reversível e pode ser interrompida através da remoção adequada do biofilme e tecido infectado (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

A cavidade, ou lesão cariosa, é a seqüela do processo da doença e é um sinal de doença avançada. As lesões cariosas são o resultado de eventos que ocorrem ao longo do tempo e sua gravidade pode variar desde alterações subclínicas na região subsuperficial dos dentes até lesões com envolvimento da dentina, podendo apresentar superfície intacta ou cavitação óbvia (FEJERSKOV, 2004; FEATHERSTONE, 2004).

A doença pode ser observada tanto na coroa, quando é chamada de cárie coronária, quanto na raiz, chamada cárie radicular, de dentes decíduos e permanentes, em superfícies lisas, sulcadas e fissuradas. Ela pode afetar o esmalte, a camada externa da coroa; o cimento, a camada mais externa da raiz; e a dentina, o tecido abaixo do esmalte e do cimento (KIDD; FEJERSKOV, 2004).

Os mecanismos do processo carioso são semelhantes para todos os tipos de cárie. Bactérias endógenas presentes no biofilme produzem ácidos orgânicos fracos como subproduto do metabolismo de carboidratos fermentáveis. Esses ácidos reduzem o pH local abaixo de um valor crítico, resultando na desmineralização dos tecidos dentários (FEJERSKOV, 2004; SCHEIE; PETERSEN, 2004). Se a perda de cálcio, fosfato e carbonato do dente continuar, ocorrerá eventualmente a cavitação (FEATHERSTONE, 2004; SEOW, 1998). Se uma cavidade se desenvolve, ela fornece um ambiente favorável para a adaptação gradual dos microrganismos do biofilme. A formação de uma lesão cavitada protege o

biofilme e, a menos que a área seja devidamente higienizada, o processo cariioso continuará (FEJERSKOV, 2004).

O risco de desenvolvimento de lesões cariosas varia ao longo da vida de um indivíduo, pois está relacionado a vários fatores. Fatores de risco físicos e biológicos incluem fluxo e composição inadequados da saliva, alta presença de bactérias cariogênicas, exposição insuficiente ao flúor, recessão gengival, componentes imunológicos, necessidade de cuidados especiais de saúde e fatores genéticos (PITTS *et al.*, 2021; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2003; HASSELL; HARRIS, 1995). Já os fatores comportamentais estão diretamente relacionados ao estilo de vida, incluindo má higiene bucal e hábitos alimentares inadequados (TOUGER-DECKER; VAN LOVEREN, 2003). É importante também destacar os fatores socioeconômicos, como pobreza, status social, nível de educação e acesso aos serviços de saúde (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2003).

O diagnóstico da lesão cariosa geralmente é feito através da observação visual das superfícies dentárias, utilizando uma sonda dental, espelho clínico e iluminação adequada. Em alguns casos, exames complementares, como radiografias, podem auxiliar no diagnóstico (GOMEZ, 2015; KUTSCH, 2014). Na prática clínica, o tratamento restaurador ainda é o método preferido em muitos países para o manejo da lesão cariosa, apesar de suas limitações e tendência à necessidade de restaurações repetidas (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

Opções de tratamento alternativos, os chamados não-restauradores, têm sido considerados promissores para reduzir a necessidade de intervenções cirúrgicas em lesões. Com esses procedimentos, consegue-se reduzir a perda de tecidos dentários, recuperando suas propriedades biológicas e físicas por meio de diferentes processos de remineralização (POZOS-GUILLÉN *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2021). Essas estratégias de gerenciamento de lesões de cárie com abordagens minimamente invasivas têm ganhado destaque desde o início da pandemia de COVID-19. Nesse período, houve uma maior ênfase na redução de procedimentos que geram aerossóis, afim de minimizar o risco de contaminação cruzada (CABALÉN *et al.*, 2022).

1.2 *Streptococcus mutans*

Embora as primeiras tentativas de definir o microbioma oral tenham sido baseadas em

técnicas de cultivo, o sequenciamento do rRNA 16S identificou mais de 700 espécies microbianas presentes na cavidade oral (DEWHIRST *et al.*, 2010; KILIAN *et al.*, 2016; ABRANCHES *et al.*, 2018), dentre as quais o *S. mutans*, há muito considerado o principal agente etiológico no desenvolvimento da cárie (FITZGERALD *et al.*, 1960). Embora o *S. mutans* não atue sozinho no processo de formação de cáries dentárias, estudos demonstraram que ele pode alterar o ambiente ao formar um meio rico em polissacarídeos extracelulares (EPS) e baixo pH, criando assim um nicho favorável para o crescimento de outras espécies acidogênicas e acidúricas (LEMOS *et al.*, 2019; ABRANCHES *et al.*, 2018).

Além do desenvolvimento de cáries dentárias, *S. mutans* também está relacionado à endocardite bacteriana, uma inflamação potencialmente fatal das válvulas cardíacas. Certas cepas dessa bactéria têm sido associadas a outras condições patológicas extraorais, como microhemorragias cerebrais, nefropatia de IgA e aterosclerose (TODA *et al.*, 2019).

Sabe-se que o potencial cariogênico do *S. mutans* está relacionado a três atributos principais: a habilidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir de sacarose, o que auxilia na colonização permanente de superfícies duras e no desenvolvimento da matriz polimérica extracelular *in situ*; a capacidade de transportar e metabolizar uma ampla variedade de carboidratos em ácidos orgânicos; e a habilidade de prosperar em condições de estresse ambiental, especialmente em baixo pH (LEMOS; BURNE, 2008).

S. mutans é capaz de produzir ácidos tanto a partir do metabolismo de fontes externas de carboidratos (amido, sacarose, frutose, etc.), quanto de fontes internas, representadas por polissacarídeos intracelulares de reserva (IPS) semelhantes ao glicogênio (HAMILTON, 1976). Uma das principais propriedades de virulência dessa bactéria é sua capacidade de formar biofilmes, processo que resulta na produção de ácidos como subproduto (CHEN *et al.*, 2015).

O habitat natural do *S. mutans* é a cavidade oral humana, mais especificamente o biofilme formado nas superfícies duras dos dentes (LEMOS; BURNE, 2008). Os dentes oferecem superfícies não descamativas que favorecem a colonização microbiana, resultando no acúmulo de grandes quantidades de bactérias e seus subprodutos nos biofilmes dentários (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

Para prevenir doenças bucais, como a cárie dentária causada pelo *S. mutans*, os

biofilmes dentários são frequentemente removidos por meio de tratamentos de higiene bucal mecânicos não específicos, como escovação e uso de fio dental (EMILSON, 1994). Agentes anti-biofilme têm a capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans* em microáreas dos dentes, restaurações dentárias ou próteses suportadas por implantes. No entanto, os agentes antimicrobianos orais utilizados atualmente são principalmente bactericidas de amplo espectro e possuem eficácia limitada na regulação da produção tanto de biofilmes quanto de fatores de virulência (KAMAREHEI *et al.*, 2022).

Os agentes tradicionais, como flúor, clorexidina e antibióticos, apresentam efeitos colaterais e baixa seletividade, podendo afetar o equilíbrio do microbioma oral. Há um crescente interesse em encontrar alternativas para controlar doenças relacionadas ao biofilme, como a cárie causada pelo *S. mutans*. No entanto, é consenso que a prevenção ou tratamento de biofilmes dentários é particularmente desafiador, devido à baixa solubilidade, breves períodos de exposição tópica, remoção pela saliva e limitada penetração do medicamento na matriz do biofilme EPS (ZHANG *et al.*, 2022). Atualmente, a remoção mecânica do biofilme segue sendo a forma mais segura e eficaz de evitar a proliferação de doenças causadas pelo *S. mutans*.

1.3 Glicosiltransferase e biofilme

O biofilme é uma comunidade de células bacterianas que aderem firmemente a uma superfície e são envolvidas por uma matriz extracelular que elas mesmas secretam. Essa matriz proporciona proteção efetiva às células bacterianas contra um ambiente hostil, formando uma comunidade estruturada (MAGANA *et al.*, 2018; LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014). O *S. mutans* utiliza vários fatores de virulência para promover a formação de biofilmes cariogênicos e o desenvolvimento de cáries dentárias, destacando-se as glicosiltransferases extracelulares. Essas enzimas são responsáveis pela formação do biofilme e convertem carboidratos, como amido, sacarose, frutose e glicose, em glucanos solúveis ou insolúveis, resultando na formação de um biofilme adesivo sobre a superfície dos dentes (FERRETTI *et al.*, 1988).

O *S. mutans* produz três GTFs geneticamente distintas (GtfB, GtfC e GtfD) sendo que cada uma delas desempenha um papel único, mas todas estão envolvidas na formação do biofilme (BOWEN; KOO, 2011). GtfB e GtfC estão associadas à aderência microbiana inicial e à estabilidade estrutural da matriz extracelular (REN; CHEN; LI; LI, 2016). GtfB sintetiza

glucanos insolúveis ricos em ligações glicosídicas α -1,3 e é absorvida na superfície da célula bacteriana para promover a formação de microcolônias densas. GtfC, que é absorvida no esmalte dentro da película adquirida, produz uma mistura de glucanos insolúveis e solúveis com ligações α -1,6, e atua como um local de ligação para as bactérias. O papel da GtfD na formação do biofilme ainda não é totalmente conhecido; no entanto, ela sintetiza glucanos solúveis, que servem como iniciadores para a atividade de GtfB (XIAO et al., 2012; HANADA; KURAMITSU, 1988; AOKI et al., 1986). Em particular, GtfC demonstrou ter a maior afinidade pela superfície de hidroxiapatita dos dentes, seguida por GtfB e, em seguida, GtfD (YAMASHITA *et al.*, 1993).

As GTFs também conferem ao *S. mutans* a capacidade de se ligar a muitas bactérias bucais (MCCABE; DONKERSLOOT, 1977; HAMADA; TAI; SLADE, 1978), mesmo aquelas que não sintetizam GTFs. Sabe-se que GtfB se liga com maior facilidade a microrganismos bucais, como *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* e o próprio *S. mutans*, do que as outras GTFs produzidas por essa bactéria, e essa ligação ocorre mesmo na presença de saliva. Além disso, a enzima mantém sua atividade quando adsorvida às bactérias, convertendo assim as não produtoras de GTF em formadoras de glucano (VACCA-SMITH; BOWEN, 1998).

Além das glicosiltransferases, *S. mutans* codifica várias proteínas ligadoras de glucano, denominadas GBP-A, -B, -C e -D. Em conjunto, as GTFs, GBPs e glucanos adesivos atuam como suporte para a formação do biofilme, que é central para a cariogenicidade desse organismo, promovendo o acúmulo local de microrganismos enquanto forma uma matriz polimérica que protege as bactérias incorporadas (LEMOS *et al.*, 2019).

Sabe-se ainda que as glicosiltransferases desempenham um papel importante na morfologia colonial, uma vez que mutações nos genes *gtfB*, cuja expressão é responsável pela qualidade e quantidade de biofilme, afetariam a produção de biofilme. Também não se descarta a hipótese de que mutações em genes como *gtfC* e *gtfD*, também afetem a formação de biofilme e conseqüentemente a morfologia das colônias bacterianas (SALAMANCA, *et al.*, 2018).

Desta forma, a caracterização bioquímica de linhagens de *S. mutans* que apresentem alterações na formação de biofilmes é relevante, uma vez que pode contribuir para uma compreensão mais detalhada sobre o papel das glicosiltransferases e dos mecanismos

moleculares envolvidos na formação do biofilme.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolamento e caracterização bioquímica de mutantes de *S. mutans* com capacidade reduzida de formação de biofilme, visando elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na formação do biofilme.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a morfologia das linhagens;
- Análise bioquímica, caracterização do crescimento, acidificação e adesividade das linhagens mutantes isoladas;
- Caracterização eletroforética das enzimas produzidas pelas linhagens mutantes em comparação com a linhagem selvagem;
- Análise genética das linhagens mutantes.

3. METODOLOGIA

3.1 Linhagem de *S. mutans*

A linhagem ATCC 25175 de *S. mutans*, obtida da Fundação André Toselo, Campinas, SP (www.bdt.fat.org.br) foi utilizada como controle (selvagem) nas análises. As linhagens com alteração na formação do biofilme (4.4 e 5.1) foram previamente isoladas no laboratório de bioquímica de microorganismos da Universidade de Uberaba (Thedei Jr., resultados não publicados).

3.2 Manutenção das linhagens de *S. mutans*

Todas as linhagens foram armazenadas a -20°C em glicerol 40% (v/v) e mantidas através de repiques sucessivos em Caldo Trípico de Soja (TSB) onde um pré-inóculo de 50 μl da bactéria armazenada foi adicionado a 4 mL do meio previamente autoclavado e incubado em uma jarra de anaerobiose, durante 24 horas a 37°C em atmosfera microaerofílica. Essa atmosfera é obtida após acender uma vela no interior da jarra para consumir parte do oxigênio disponível. Assim, a partir deste inóculo inicial, as células foram submetidas a mais um repique de 12 horas a 37°C , estando assim disponíveis para utilização nos experimentos.

3.3 Soluções

Sais completos: 0,1 g de FeSO_4 ; 0,1 g de MnCl_2 ; 13,2mg de KH_2PO_4 ; 26,6 mg de K_2HPO_4 e 26 mg de KCl, cada um dissolvido em 100 mL de água destilada. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar e autoclavados à 121°C durante 15 minutos. Após o preparo das soluções, foi adicionado 5 mL de clorofórmio a cada uma, como agente preservante.

Solução de sacarose 2M: 13,69g de sacarose em 20 mL de volume final de água destilada. Após o preparo, a solução foi autoclavada à 121°C durante 15 minutos e adicionada ao meio de cultura (sólido ou líquido, concentração final 50 mM) após autoclavagem do meio.

Solução de glicose 2M: 7,2g de glicose em 20 mL de volume final de água destilada. Após o preparo, a solução foi autoclavada à 121°C durante 15 minutos e adicionada ao meio de cultura (sólido ou líquido, concentração final 50 mM) após autoclavagem do meio.

Solução I: 6% SDS, 3% mercaptoethanol, 0.02% azul de bromofenol, 8 M ureia. Os reagentes foram adicionados um a um em água destilada, sob agitação, até completa dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Solução II: 50 mM Tris-HCl foi adicionado em água destilada, sob agitação, até completa

dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Solução III: 0.05% dextran, 2% Tween-100 e 5% sacarose. Os reagentes foram adicionados um a um em água destilada, sob agitação, até completa dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Solução fixadora: 10% ácido tricloroacético foi adicionado em água destilada, sob agitação, até completa dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Solução de lavagem I: 5% ácido acético foi adicionado em água destilada, sob agitação, até completa dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Solução de lavagem II: 25% etanol, 10% ácido acético, em água destilada. Os reagentes foram adicionados um a um em água destilada, sob agitação, até completa dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Solução de oxidação: 1% ácido periódico foi adicionado em água destilada, sob agitação, até completa dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Solução de redução: 0,5% metabissulfito de potássio foi adicionado em água destilada, sob agitação, até completa dissolução. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

3.4 Gel de eletroforese:

Gel 7,5%: 5 mL de Acrilamida 30%, 5 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 200 µl SDS 10%, 9,48 mL de H₂O (Milli-Q), 100 µl de Persulfato de Amônio e 20 µl de tetrametiletenodiamina (TEMED).

Gel 4%: 800 µl de Acrilamida 30%, 1500 µl de Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8), 60µl SDS 10%, 3,57 mL de H₂O_{MQ}, 30 µl de Persulfato de Amônia e 12 µl de tetrametiletenodiamina (TEMED).

3.5 Meios de cultivo

Meio Completo: O meio completo descrito por Dashper e Reynolds (1992) foi utilizado. Inicialmente realizou-se a confecção dos sais completos, conforme descrito acima.

Para a preparação do meio completo usou-se 10 g/L tripton; 5 g/L extrato de levedura; 60 µmol/L MgSO₄; 1.3 µmol/L FeSO₄; 1.5 µmol/L MnCl₂; 0.2 mmol/L KH₂PO₄; 0.3 mmol/L K₂HPO₄; 0.7 mmol KCl dissolvidos em água e o meio foi então autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

Quando necessário, o meio completo foi acrescido de ágar-ágar 20 g/L para a produção de

meio completo sólido.

Meio TSB: O meio líquido utilizado para repiques e manutenção das cepas de *S. mutans* foi o Tryptic Soy Broth (TSB), preparado de acordo com as instruções do fabricante, o qual resulta em 13 mM de glicose, 17 g/L de digesto pancreático de caseína, 3 g/L de digesto papaico de farinha de soja; 5 g/L de NaCl, 2,5g/L de K₂HPO₄. O meio (4 mL) foi distribuído em tubos falcon de 15 mL e posteriormente autoclavado.

Todos os meios, soluções e materiais necessários foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

3.6 Isolamento das linhagens mutantes

Para o isolamento das linhagens mutantes previamente realizado no laboratório de microorganismos da Universidade de Uberaba (Thedei Jr., dados não publicados), uma colônia de *S. mutans* crescida em Meio Completo com sacarose como fonte de carbono foi isolada e suspensa em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. 100 µl dessa suspensão foi inoculado em placa de Petri contendo Meio Completo com sacarose como fonte de carbono e incubada em atmosfera microaerofílica (técnica da vela, conforme descrito acima) por 48 horas. Colônias com morfologia alterada foram quantificadas, isoladas e cultivadas em Meio TSB. Após confirmação bioquímica, foram armazenadas congeladas em glicerol 50% e empregadas nos experimentos.

3.7 Avaliação da morfologia:

Um pré-inóculo de 50 µl da bactéria congelada (ATCC 25175) foi adicionado a 10 mL de TSB e incubado em jarra de anaerobiose, durante 24 horas a 37°C em atmosfera microaerofílica. Assim, a partir deste inóculo inicial, as células foram submetidas a mais um repique de 12 horas a 37°C em 10 ml de TSB. Foi feita uma diluição seriada das bactérias em meio completo até a concentração 10⁻⁵, de onde foi retirado 50 µl que foi espalhado sobre uma placa de meio sólido com sacarose e 50 µl em placa de meio sólido com glicose. O mesmo procedimento foi feito separadamente para cada cepa, totalizando em 6 placas de cada linhagem (3 com glicose e 3 com sacarose). As placas foram incubadas em uma jarra de anaerobiose, durante 24 horas a 37°C em atmosfera microaerofílica. Após o tempo previsto a morfologia das culturas foi analisada sob estereomicroscópio e imagens das colônias foram capturadas através do microscópio digital Dino-Lite AM4113 (Taiwan, China).

3.8 Avaliação da morfologia através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

Para a análise da morfologia celular, foram preparados 3 tubos com 5 mL de meio de cultura

completo e no interior de cada um dos tubos foi acrescentada uma lamínula de vidro circular (1cm de diâmetro). Após autoclavagem e resfriamento do meio, foi adicionada sacarose na concentração de 50 mMol/L e realizado o inóculo das linhagens selvagem e mutantes, posteriormente incubadas a 37°C em atmosfera microaerofílica (técnica da vela, conforme descrito acima) por 15 horas.

Após o tempo de crescimento, as lamínulas foram removidas dos tubos, lavadas gentilmente com água destilada, tratadas com glutaraldeído 1% e processadas para visualização no MEV.

As amostras foram cobertas por pulverização catódica, uma técnica que emprega a ejeção de átomos e *clusters* atômicos de um material altamente puro, no caso ouro e carbono, condensando-os na forma de filmes finos ou nanopartículas sobre a superfície de um substrato. Para este processo foi utilizada a metalizadora Bal Tec SCD050 Sputter Coater (Fürstentum-Liechtenstein), por um tempo de 180 segundos.

Para a obtenção das imagens, foram utilizados o Microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss EVO50 (Cambridge, UK) e o Microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550 (Kyoto, Japan), em aumentos de 300 vezes e 10.000 vezes.

3.9 Análise bioquímica das linhagens mutantes

As linhagens foram crescidas em meio caldo BHI (Brain Heart Infusion – Infusão de Cérebro Coração, DIFCO) para realização dos testes, como descrito abaixo.

a) Prova da Catalase: 1 gota de cada cultura foi adicionada em uma lâmina de microscópio limpa e acrescentou-se uma gota de H₂O₂ sobre cada amostra. O resultado é considerado positivo quando a amostra borbulhar. Para bactérias do grupo mutans, espera-se um resultado negativo.

b) Fermentação do Sorbitol e Manitol: adicionou-se 0,1 mL de cultura pura das linhagens (cultura em caldo BHI a 37°C durante 48h) em meio base (caldo BHI) contendo o açúcar (manitol ou sorbitol) e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Foi incubado a 37°C durante 48h. A prova positiva é dada pela mudança de cor do meio de roxo para amarelo. Para bactérias do grupo mutans, espera-se um resultado positivo.

c) Hidrólise da Esculina: adicionou-se 0,1 mL de cultura pura do microrganismo em meio base contendo esculina e incubou-se a 37°C por 48h. Após o crescimento, adicionou-se o cloreto férrico. O resultado é considerado positivo quando se observar a formação de coloração verde-escuro. Para bactérias do grupo mutans, espera-se um resultado positivo.

d) Hidrólise da Arginina: adicionou-se 0,1 mL de cultura pura do microrganismo em meio

base contendo arginina e incubou-se a 37°C por 48h, posteriormente adicionou-se reativo de Nessler. O resultado positivo se dá pelo aparecimento de coloração alaranjada. Para bactérias do grupo mutans, espera-se um resultado negativo.

3.10 Caracterização do crescimento e acidificação das linhagens mutantes

Um pré-inóculo de 50 µl de cada bactéria armazenada (ATCC e mutantes) foi adicionado a 10 mL de TSB e incubado durante 24 horas a 37°C em atmosfera microaerofílica, conforme descrito acima. Assim, a partir deste inóculo inicial, as células foram submetidas a mais um repique de 12 horas a 37°C em 10 mL de TSB.

A absorbância da cultura foi acertada para 0,2 (620 nm) com TSB. Foram preparados 6 tubos Falcon de 50 mL, 3 contendo 25 mL de meio completo e 625 µl de solução de sacarose e 3 contendo 25 mL de meio completo e 625 µl de solução de glicose.

A cada tubo de meio de cultura com sua respectiva fonte de carbono foi adicionado 500 µl da linhagem a ser testada, cuja absorbância foi previamente acertada para 0,2. Em seguida, 1 mL de cada suspensão foi adicionado em cada poço de uma placa de cultura de células de 24 poços, totalizando em 24 poços para cada linhagem, 12 com sacarose e 12 com glicose.

A placa foi incubada a 37°C em atmosfera microaerofílica, sendo retirados 4 poços nos intervalos de: 4h, 6h e 8h. Em cada um destes intervalos foi realizada a leitura da absorbância (620 nm) e pH de cada poço. Cada vez que a cultura foi retirada para leitura, seu respectivo poço foi lavado com água destilada.

Para quantificar o biofilme formado, ao final das 8h de cultivo, os poços foram corados com cristal violeta 0,1% por 1h. Depois, o corante foi descartado e os poços lavados abundantemente com água destilada. 1ml de álcool etílico absoluto foi adicionado em cada poço e a placa foi armazenada por mais 1h sob resfriamento. Posteriormente, 100 µl do conteúdo de cada poço foi adicionado a um tubo eppendorf contendo 900 µl de água e a leitura da absorbância foi realizada em 550 nm.

3.11 Caracterização eletroforética:

A extração da enzima GTF foi feita conforme descrito por Thurnheer *et al.* (2006), onde um pré-inóculo de 50 µl da bactéria armazenada foi adicionado a 10ml de TSB e posteriormente incubado em uma jarra de anaerobiose, durante 24 horas a 37°C em atmosfera microaerofílica. Assim, a partir deste inóculo inicial, as células foram submetidas a mais um repique de 12 horas a 37°C em 9 mL de meio completo mais 1 mL de solução do carboidrato em teste (glicose ou sacarose).

Ainda conforme Thurnheer *et al.* (2006), após 12 horas de crescimento, as bactérias foram centrifugadas e o precipitado foi incubado com 500µl da solução I à 37°C por 90 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada e 15 µl do sobrenadante foi aplicado em um gel de eletroforese 7,5% contendo SDS conforme descrito por Laemmli (1970). Depois da eletroforese, o gel foi lavado 3 vezes de 30 minutos com a solução II. Em seguida, o gel foi incubado por 12h a 37°C com a solução III, também conforme Thurnheer *et al.* (2006).

Posteriormente, o gel foi transferido para uma placa de petri onde permaneceu por 10 minutos a 30°C com a solução fixadora. Depois, o gel foi lavado 2 vezes por 2 minutos com a solução de lavagem I e então submergido na solução de oxidação por 20 minutos a 30°C. O gel foi então lavado novamente com a solução de lavagem I por 2 vezes de 2 minutos, lavado mais 2 vezes por 2 minutos com água e então mergulhado na solução de redução por 12 minutos a 30°C. Passado esse tempo, o gel foi lavado 2 vezes por 2 minutos com a solução de lavagem II a 50°C. Após a última lavagem, o gel foi corado com a técnica do Ácido Periódico de Schiff por 50 minutos ao abrigo da luz. Esse procedimento foi descrito por Zacharius *et al.* (1969).

Em seguida, o gel foi posicionado em um transiluminador de luz visível e fotografado utilizando uma régua como escala. A mobilidade relativa das proteínas no gel foi determinada pela razão: migração da banda de atividade (cm)/migração do front (cm).

3.12 Preparação de DNA:

As linhagens foram crescidas separadamente em tubos de ensaio contendo 5 mL de TSB em microarofilia a 37°C por 24h. Após este período, as culturas de cada linhagem foram transferidas para tubos de 15 mL onde foram centrifugadas a 3200 rpm por 8 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de salina 0,7 M por três vezes, e entre os intervalos de cada lavagem foram centrifugados a 3200 rpm por 8 min em temperatura ambiente. Logo após a terceira centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL da solução de salina 0,7 M e transferidas para um tubo de 2 mL. As células foram então centrifugadas a 10000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. Feito isso, as mesmas foram ressuspensas em 545 µL TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA) contendo lisozima (20 mg/mL) e depois incubadas a 37°C por 30 min em Banho Maria, agitando-se a cada 5 min no vortex.

Em seguida foram adicionados 50 µL de SDS 20% e as células incubadas a 65°C por 15 min em Banho Maria (agitando-se também a cada 5 min no vortex). Então foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e o tubo foi agitado por inversão. Na sequência, foram adicionados 80 µL de CTAB 10%

diluído em 0,7M NaCl, o material foi agitado por inversão e incubado novamente a 65°C por 20 min. Foram adicionados então 750 µL de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25:24:1) e todo o material submetido a agitação em vortex seguida de centrifugação por 5 min a 11 000 rpm. Após esta centrifugação, foram observadas 3 fases, sendo que é retirada a fase aquosa superior, e transferida para outro tubo de 2 mL. Foram adicionados a esse material 750 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitou-se novamente no vortex, procedendo-se à centrifugação a 11 000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. Após essa etapa, retirou-se novamente a fase superior e transferiu-se a mesma para um novo tubo de 2 mL. A esta fase aquosa, foram adicionados 750 µL de isopropanol gelado, e essa mistura homogeneizada gentilmente por inversão, e em seguida deixada em gelo por 1 hora a fim de precipitar o material genético obtido. Neste passo, pode-se perceber a formação de um emaranhado fibroso dentro da solução (“medusa”).

Após esse período em gelo, o material foi centrifugado novamente a 12.000 rpm por 30 min a 4°C, e após esta centrifugação realizou-se o descarte do sobrenadante e o pellet obtido foi lavado 2 vezes com 1 mL de EtOH 70% (sem ressuspender o “pellet”). Em seguida, o pellet foi lavado 1 vez com 1mL de EtOH absoluto e deixado secar por 20 min. O pellet obtido foi ressuspensionado em 30 µL de água MilliQ estéril para as análises posteriores.

3.13 Eletroforese de DNA em gel de agarose:

Após a extração do DNA das linhagens, amostras foram preparadas com a adição de tampão de carregamento e aplicadas em géis de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5 µg/ml. As corridas foram realizadas em tampão de corrida TAE 1X a 80V. Os géis foram observados e fotografados sob luz ultravioleta para análise.

3.14 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se 200 ng de DNA genômico, 1 uM de cada primer, sendo que os desoxinucleotídeos, a TaqDNA polimerase e o tampão foram acrescentados na forma de um MIX do kit GoTaq Green Master Mix (Promega). O número de ciclos de reação foi de 35 para cada conjunto de primers dos genes analisados. O ciclo consistiu de uma etapa de desnaturação a 95°C por 45 segundos, seguida pelo anelamento dos primers a 49°C por 30 segundos e uma etapa final de extensão das novas cadeias a 72°C por 45 segundos. Os resultados das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Os primers utilizados, conforme Lei *et al.*, (2015), estão indicados no quadro abaixo.

Primer	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')
gtfB-F	ACACTTTCGGGTGGCTTG
gtfB-R	GCTTAGATGTCACTTCGGTTG
gtfC-F	CCAAAATGGTATTATGGCTGTGC
gtfC-R	TGAGTCTCTATCAAAGTAACGCAG
gtfD-F	AATGAAATTCGCAGCGGACTTGAG
gtfD-R	TTAGCCTGACGCATGTCTTCATTGTA
ftf-F	ATTGGCGAACGGCGACTTACTC
ftf-R	CCTGCGACTTCATTACGATTGGTC
vicR-F	CGCAGTGGCTGAGGAAAATG
vicR-R	ACCTGTGTGTGTCGCTAAGTGATG
vicK-F	CACTTTACGCATTCGTTTTGCC
vicK-R	CGTTCTTCTTTTTCTGTTCGGTC
vicX-F	TGCTCAACCACAGTTTTACCG
vicX-R	GGACTCAATCAGATAACCATCAGC
vicX-P1	CCAGATTTTTCTTCACCCTTAC
vicX-P2	GGCGCGCCTGATACCTCGCCAGATACTG
vicX-P3	GGCCGGCCCACTTTTTCGGTCTATTTCTGC
vicX-P4	AGGCTTGGGTATTCCTAAG
gtfB-F	ACACTTTCGGGTGGCTTG

Quadro 1 – Primers utilizados e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

3.15 Análise Estatística:

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica e submetidos à análise de normalidade por meio do teste de D'Agostino & Pearson, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para comparação das três linhagens, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn.

Os dados foram expressos em Mediana, Mínimo e Máximo.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento das linhagens mutantes

As placas obtidas foram analisadas em estereomicroscópio e seus resultados foram sumarizados no quadro 2.

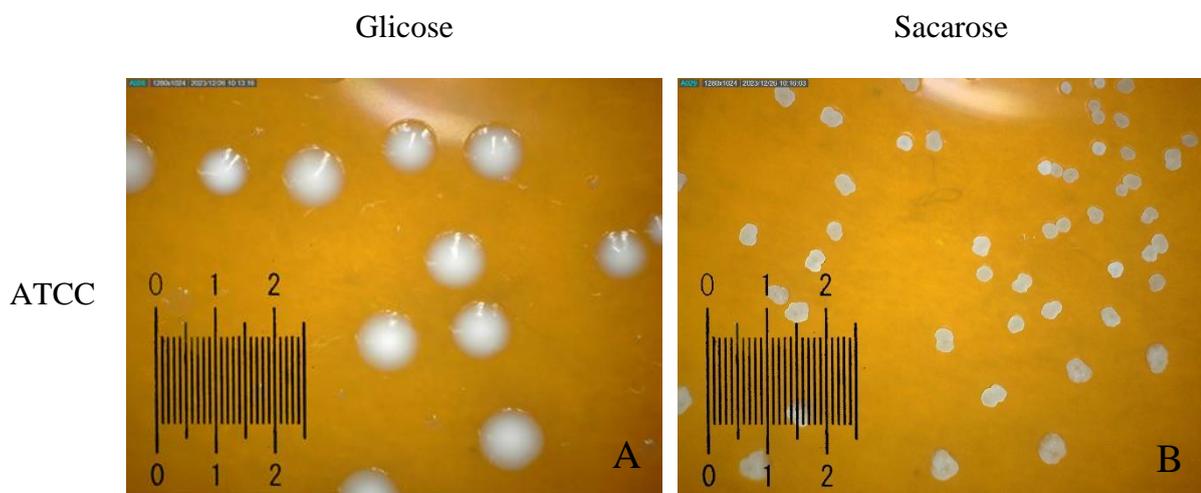
Quadro 2 - Contagem de colônias crescidas em meio completo sólido e sacarose.

Linhagem	Morfologia das colônias	Número de colônias	Porcentagem
ATCC	Rugosa	334	93,29%
	Lisa	24	6,70%

Fonte: Thedei Jr. Dados não publicados.

4.2 Avaliação da morfologia

Quanto à morfologia das linhagens analisadas, quando cultivadas em meio completo com glicose, a linhagem controle ATCC formou colônias com superfície lisa (Figura 1A). Em meio completo com sacarose, as colônias apresentaram superfície granular ou rugosa (Figura 1B). Por outro lado, as duas linhagens mutantes apresentaram crescimento com aparência lisa em ambas as fontes de carbono (Figura 1, C, D, e e F).



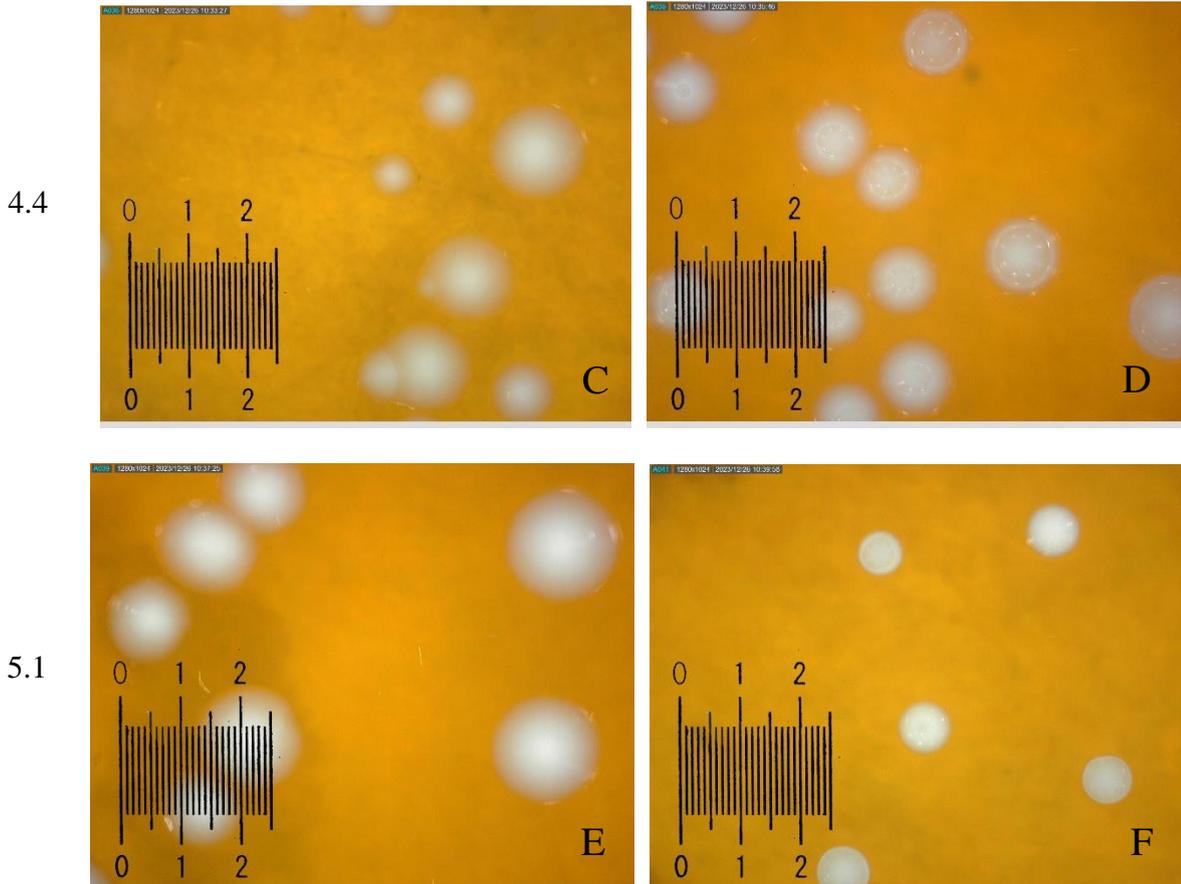


Figura 1 - Crescimento de *S. mutans* em meio completo sólido. Linhagem ATCC 25175 em glicose (A) e sacarose (B); linhagem mutante 4.4 em glicose (C) e em sacarose (D); linhagem mutante 5.1 em glicose (E), e em sacarose (F). Aumento de 40x.

4.3 Avaliação da morfologia em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

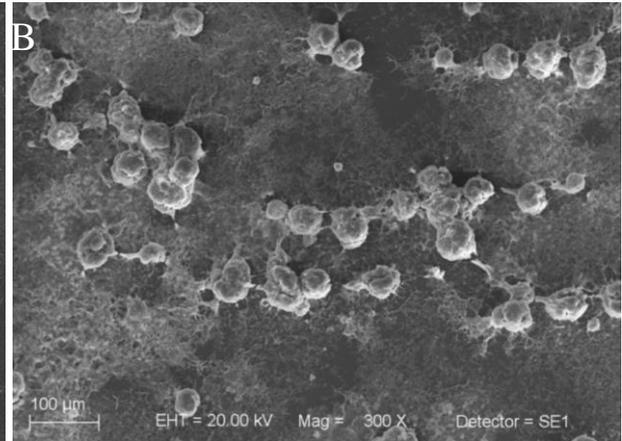
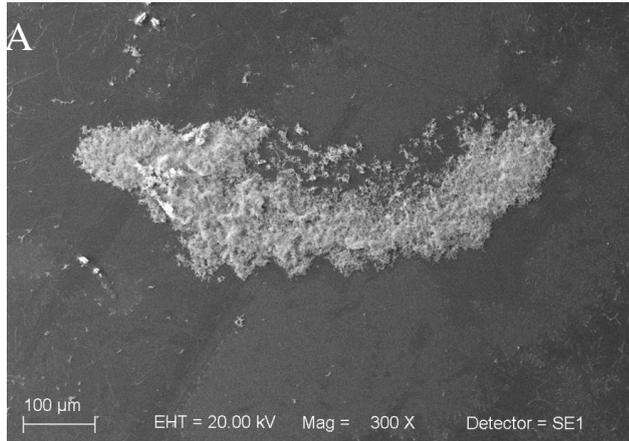
A morfologia das linhagens mutantes foi analisada em microscopia eletrônica de varredura em comparação à linhagem selvagem. Na Figura 2B pode-se observar a formação de agregados na linhagem selvagem quando crescida em sacarose, e a ausência destes agregados na linhagem selvagem crescendo em glicose (Figura 2A) e também em ambas as linhagens mutantes após crescimento em glicose (Figura 2 C e E) e na linhagem 4.4 crescendo em sacarose (Figura 2 D). Raros agregados foram observados na linhagem 5.1 crescendo em sacarose (Figura 2F).

Na Figura 3 podemos ver que as três linhagens apresentam a morfologia de cocos que formam linhas ou pares, e portanto, não há discrepância quanto à morfologia celular das linhagens 4.4 e 5.1 quando comparadas com a ATCC.

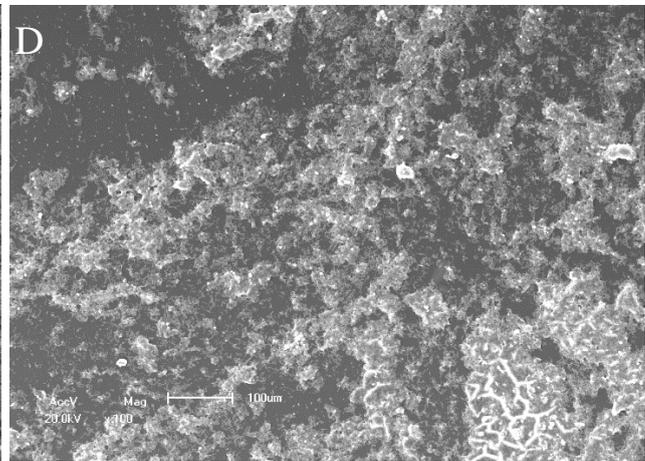
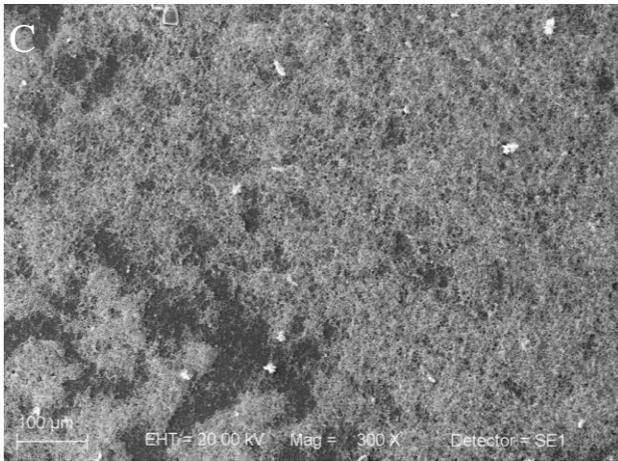
Glicose

Sacarose

ATCC



4.4



5.1

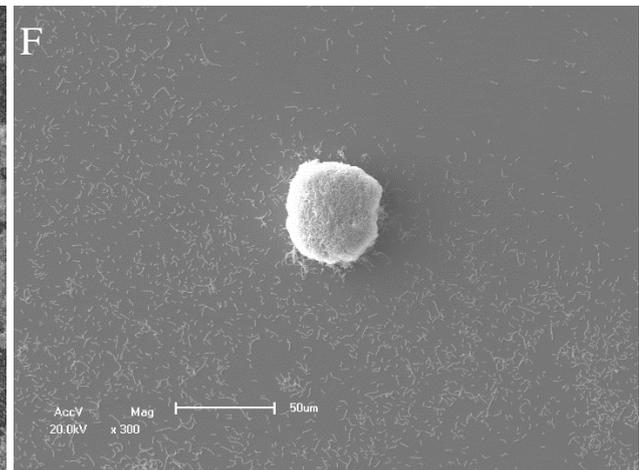
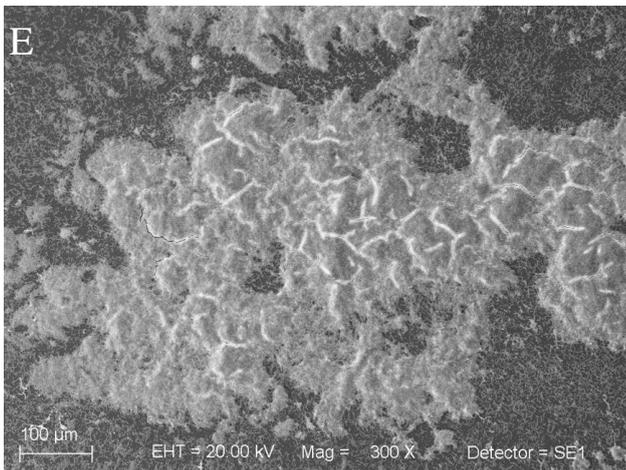


Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura das linhagens de *S. mutans*. Linhagem ATCC 25175 após crescimento em meio completo com glicose (A) e sacarose (B), linhagem mutante 4.4 em glicose (C) e sacarose (D), linhagem mutante 5.1 em glicose (E) e sacarose (F). Aumento de 300x.

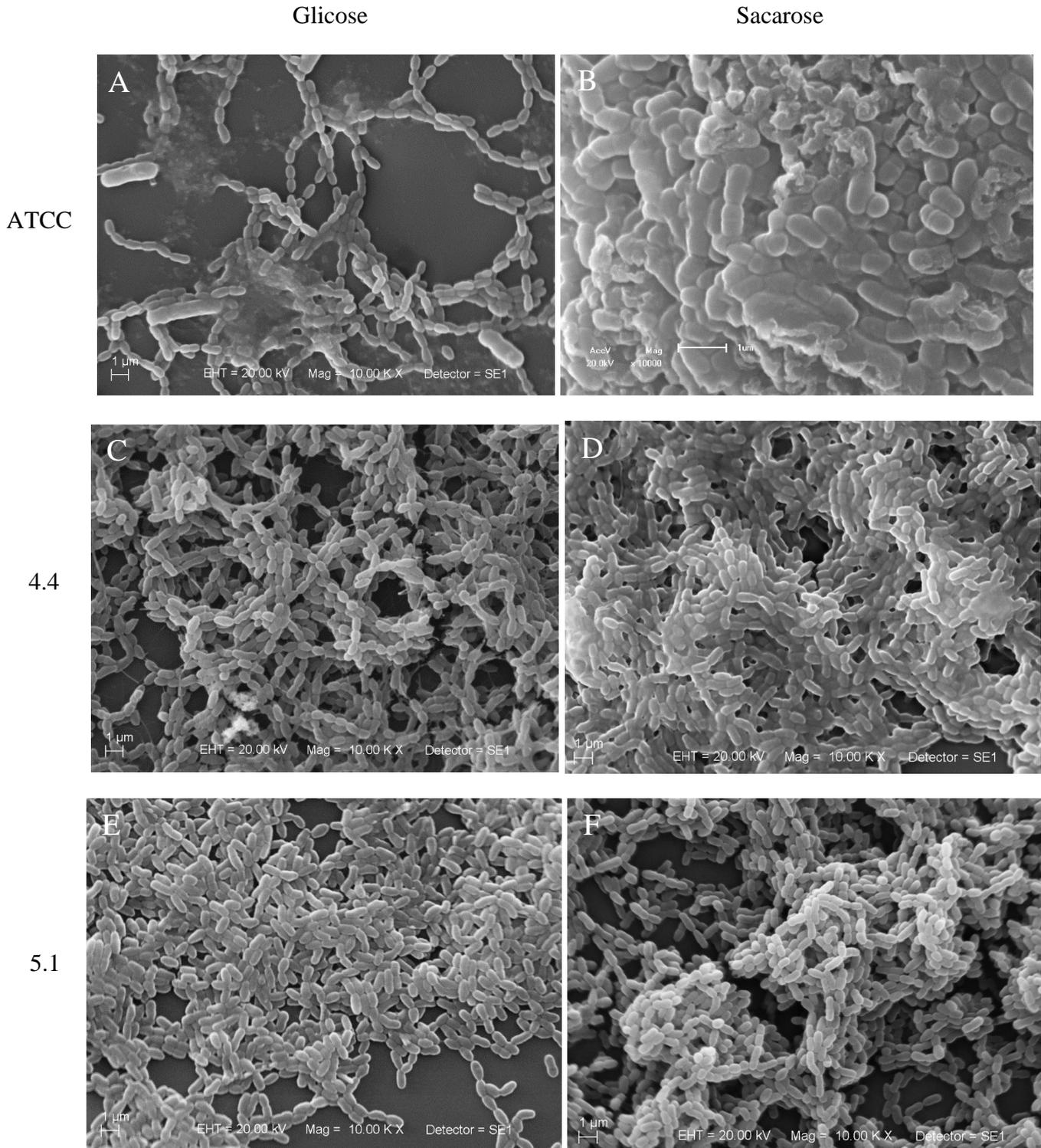


Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura das linhagens de *S. mutans*. Linhagem ATCC 25175 após crescimento em meio completo com glicose (A) e sacarose (B), linhagem mutante 4.4 em glicose (C) e sacarose (D), linhagem mutante 5.1 em glicose (E) e sacarose (F). Aumento de 10.000x.

4.4 Análise bioquímica das linhagens mutantes

O meio de cultura da linhagem ATCC e das linhagens mutantes 4.4 e 5.1 não borbulharam quando em contato com H_2O_2 , apresentando, portanto, resultado negativo na prova da catalase. Na fermentação do sorbitol e manitol, as linhagens apresentaram um resultado positivo, mudando a cor do meio de roxo para amarelo. As mesmas linhagens também formaram coloração verde-escuro na hidrólise da esculina, resultando em prova positiva. Na hidrólise da arginina o resultado foi negativo, não apresentando o aparecimento da coloração alaranjada. Esses resultados podem ser observados no quadro 3.

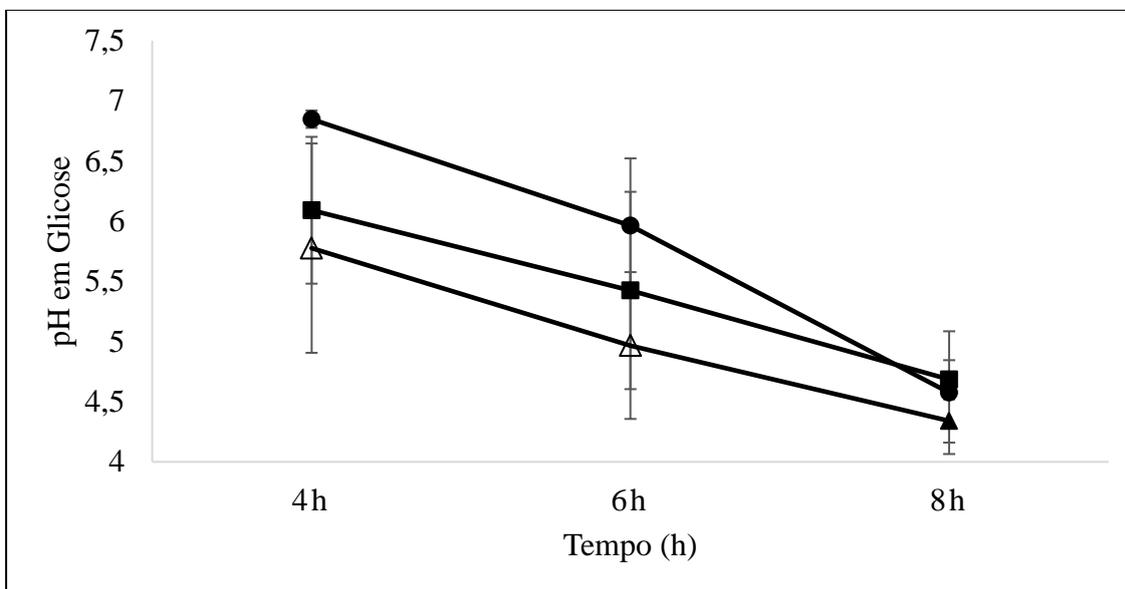
Quadro 3 – Resultados da análise bioquímica das linhagens estudadas.

Linhagem	Catalase	Manitol	Sorbitol	Arginina	Esculina
ATCC	-	+	+	-	+
5.1	-	+	+	-	+
4.4	-	+	+	-	+

4.5 Curva de crescimento

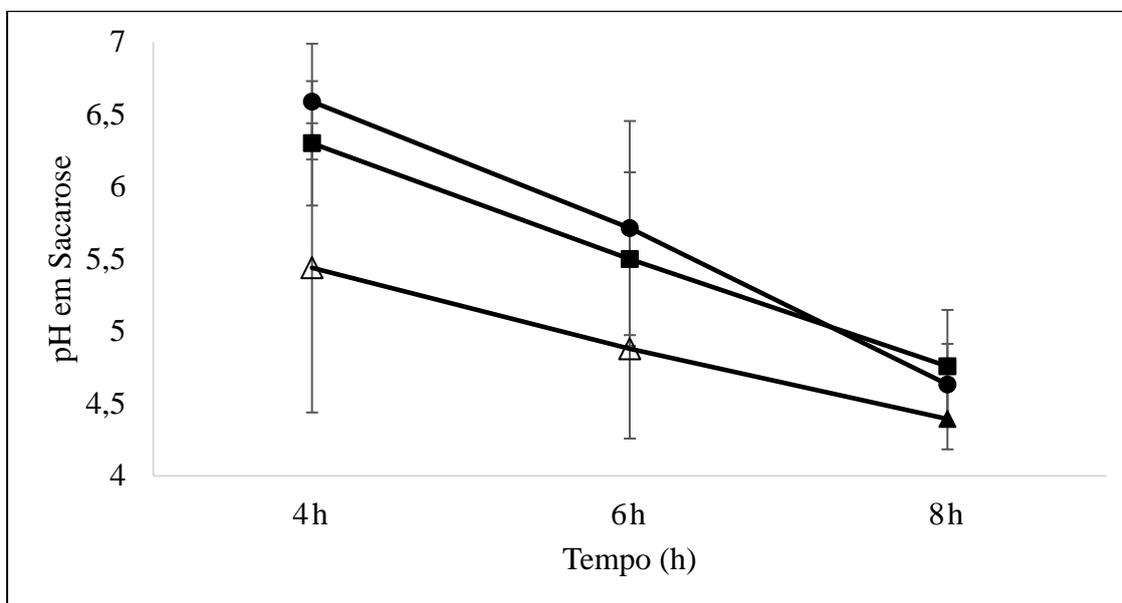
No Gráfico 1, observamos que as três linhagens acidificaram o meio de cultura de maneira similar após 8h de crescimento em meio suplementado com glicose como fonte de carbono. O padrão de acidificação foi similar para as 3 linhagens após 8 horas de cultivo, embora nos tempos 4 e 6 horas de crescimento a linhagem 5.1 tenha acidificado o meio significativamente mais do que a linhagem ATCC (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Leitura de pH das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5.1 (▲) em meio suplementado com glicose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.



Quando o carboidrato foi a sacarose, as três linhagens também acidificaram o meio de cultura de maneira similar após 8 horas de cultivo (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn, $p=0,0019$), atingindo valores ao redor de 5, conforme observado no Gráfico 2. Da mesma forma que para o crescimento em glicose, a linhagem 5.1 acidificou o meio significativamente mais do que a linhagem ATCC nos tempos 4 e 6 horas (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn, $p=0,0718$ e $p>0,1000$, respectivamente).

Gráfico 2 - Leitura de pH das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5.1 (▲) em meio suplementado com sacarose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.



Quanto ao crescimento em suspensão em meio suplementado com glicose, as três linhagens apresentaram padrão similar ao final da curva de crescimento (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn, $p=0,0022$) (Gráfico 3). Apenas no tempo 4hs a linhagem 5.1 apresentou uma acidificação significativamente superior à linhagem ATCC (Gráfico 3). Quando o meio foi suplementado com sacarose, foi observado um baixo crescimento planctônico da linhagem ATCC e uma acidificação maior das linhagens mutantes nos tempos 4, 6 e 8 horas (linhagem 5.1) (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn, respectivamente $p<0,0001$, $p=0,0385$, $p=0,0063$) e 6 e 8 horas (linhagem 4.4) (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn, respectivamente $p>0,1000$ e $p=0,0011$) (Gráfico 4).

Gráfico 3 - Absorbância em 620_{nm} das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5.1 (▲) em meio completo com glicose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

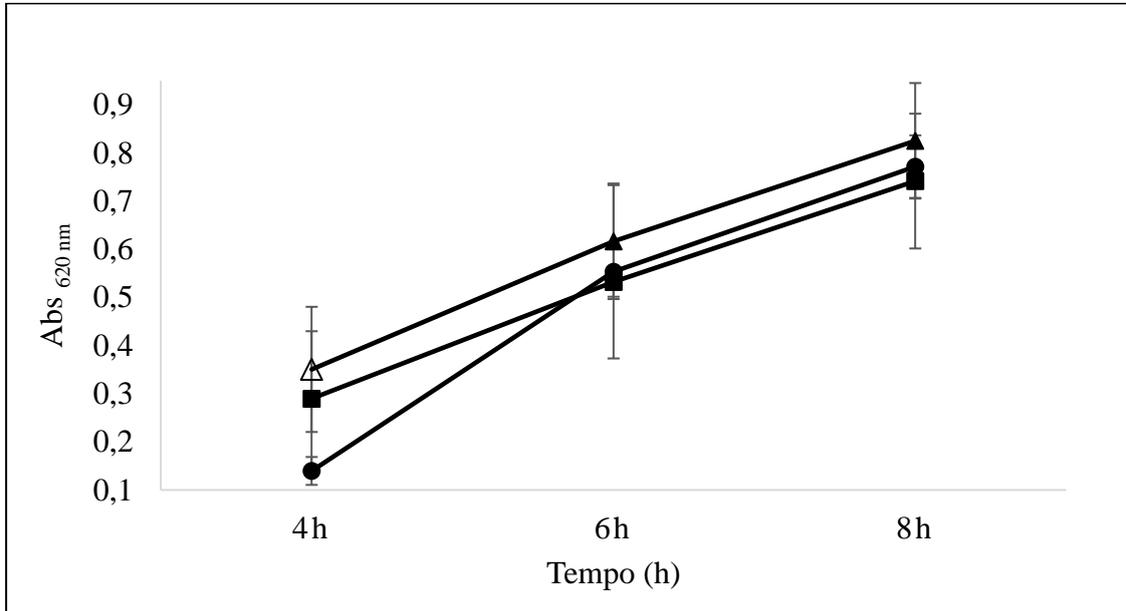
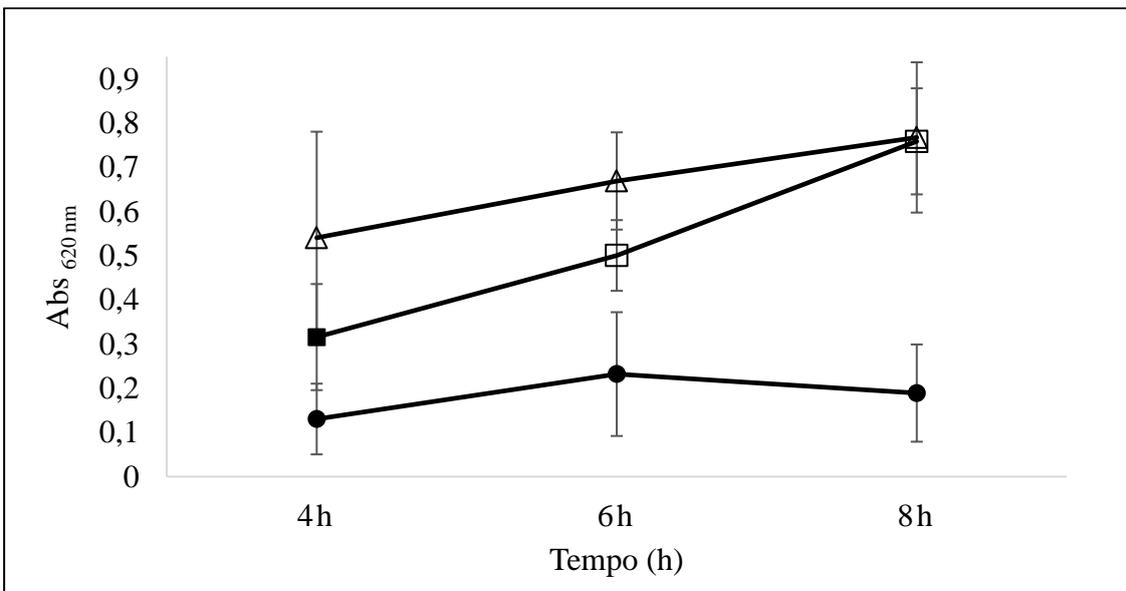


Gráfico 4 - Absorbância em 620_{nm} das linhagens ATCC (●), 4,4 (■) e 5.1 (▲) em meio completo com sacarose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.



As três linhagens formaram biofilme em meios suplementados com glicose (Gráfico 5), embora as linhagens mutantes tenham uma formação de biofilme significativamente inferior à linhagem ATCC (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn, respectivamente $p=0,0006$). O mesmo resultado é observado em meio suplementado com sacarose (Gráfico 6), onde se observa que a linhagem ATCC forma mais biofilme do que as linhagens mutantes (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn, $p=0,0044$).

Gráfico 5 - Absorbância em 550_{nm} das cepas ATCC (●), 4,4 (■) e 5.1 (▲) em meio completo com glicose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn.

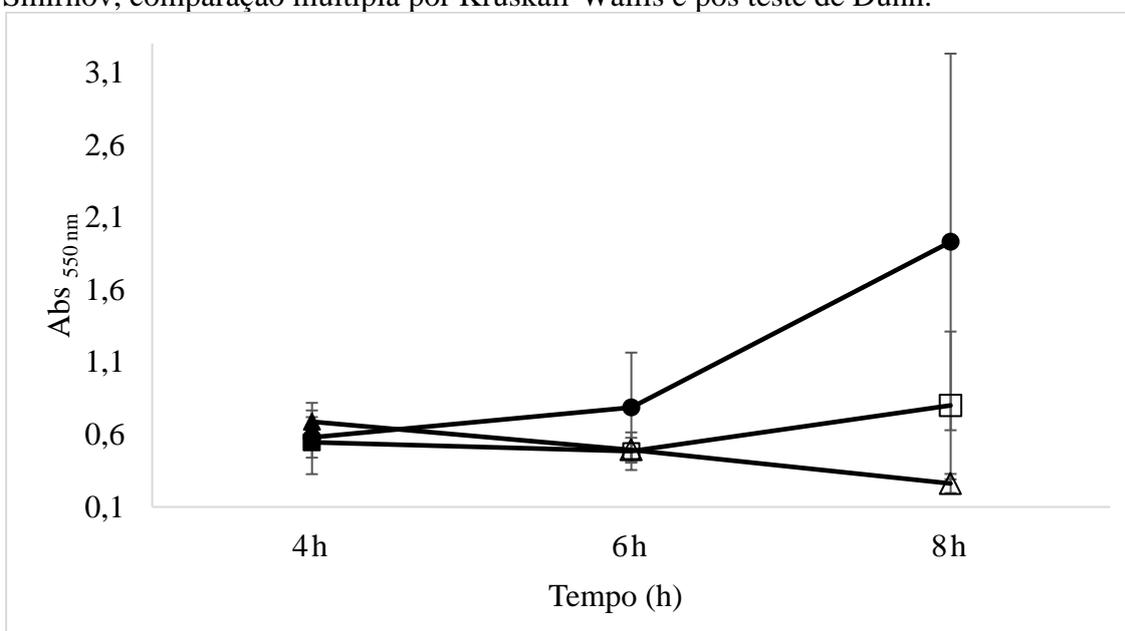
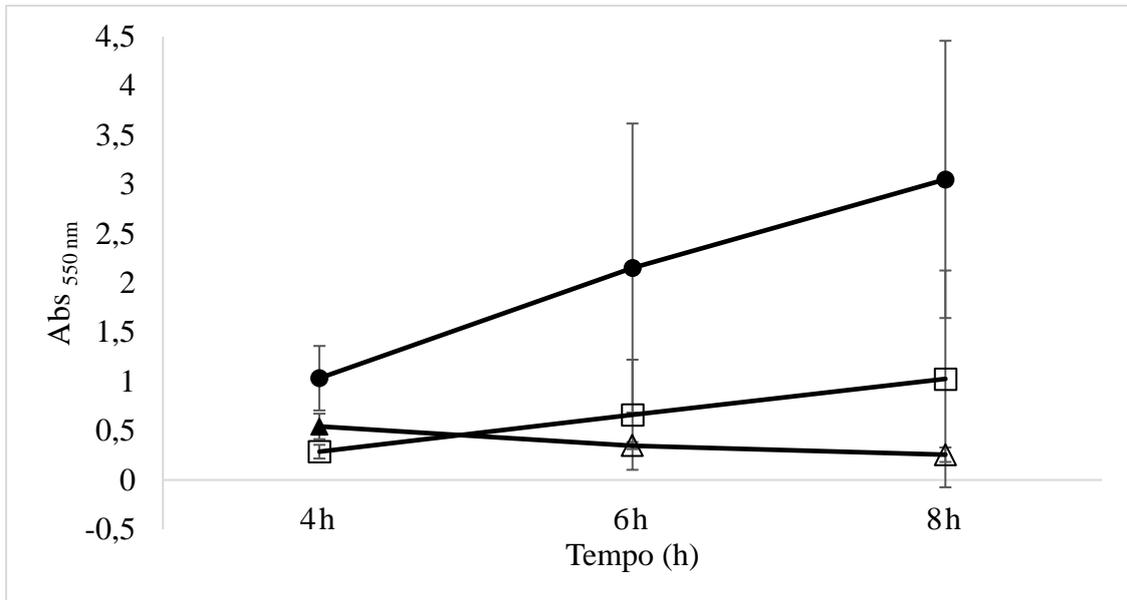


Gráfico 6 - Absorbância em 550nm das cepas ATCC (●), 4,4 (■) e 5.1 (▲) em meio completo com sacarose. Símbolos abertos significam diferença estatística em relação à linhagem selvagem no mesmo tempo de crescimento. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, comparação múltipla por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.



O tratamento dos biofilmes com cristal violeta 0,1% reforça as observações das curvas de crescimento descritas acima, onde a linhagem ATCC forma expressivamente mais biofilme quando cresce em sacarose do que quando cresce em glicose (Figura 4).

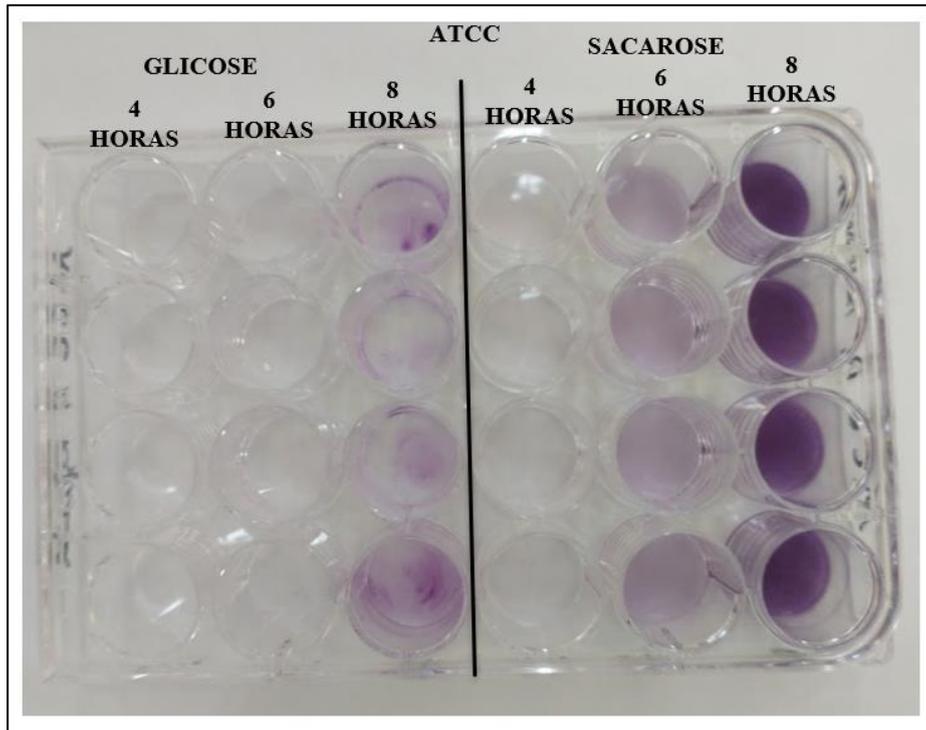


Figura 4 - Coloração com cristal violeta referente ao crescimento de ATCC em glicose e sacarose.

Já as linhagens mutantes formam uma quantidade consideravelmente menor de biofilme, na avaliação visual, do que a linhagem ATCC, tanto em meios suplementados com glicose quanto com sacarose (Figuras 5 e 6).

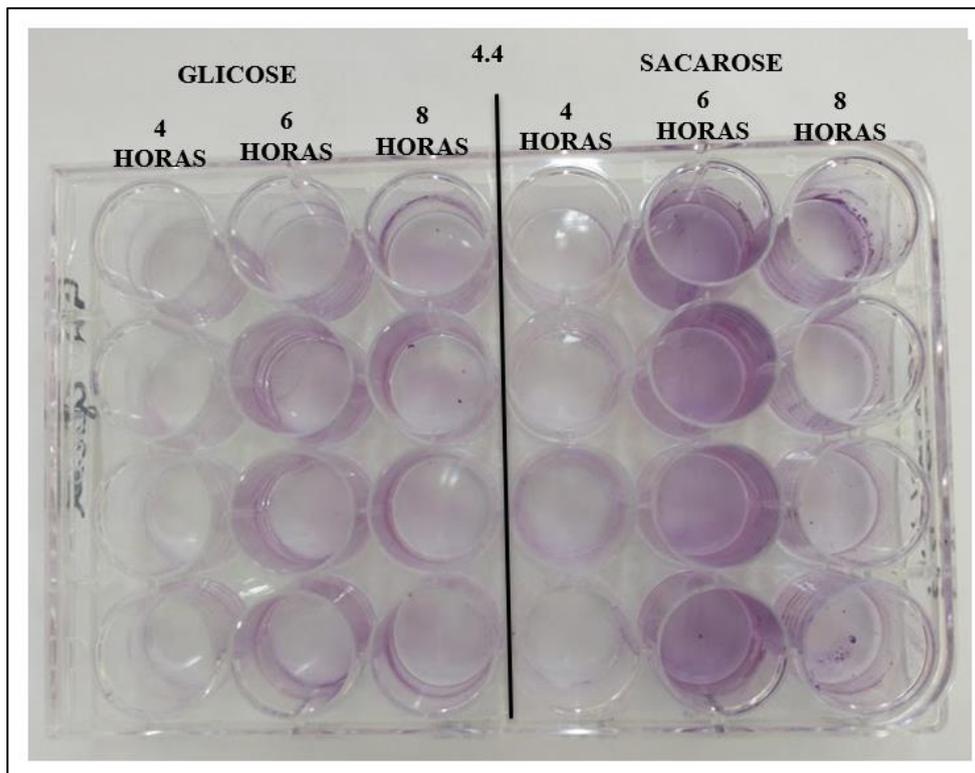


Figura 5 - Coloração com cristal violeta referente ao crescimento de 4.4 em glicose e sacarose.

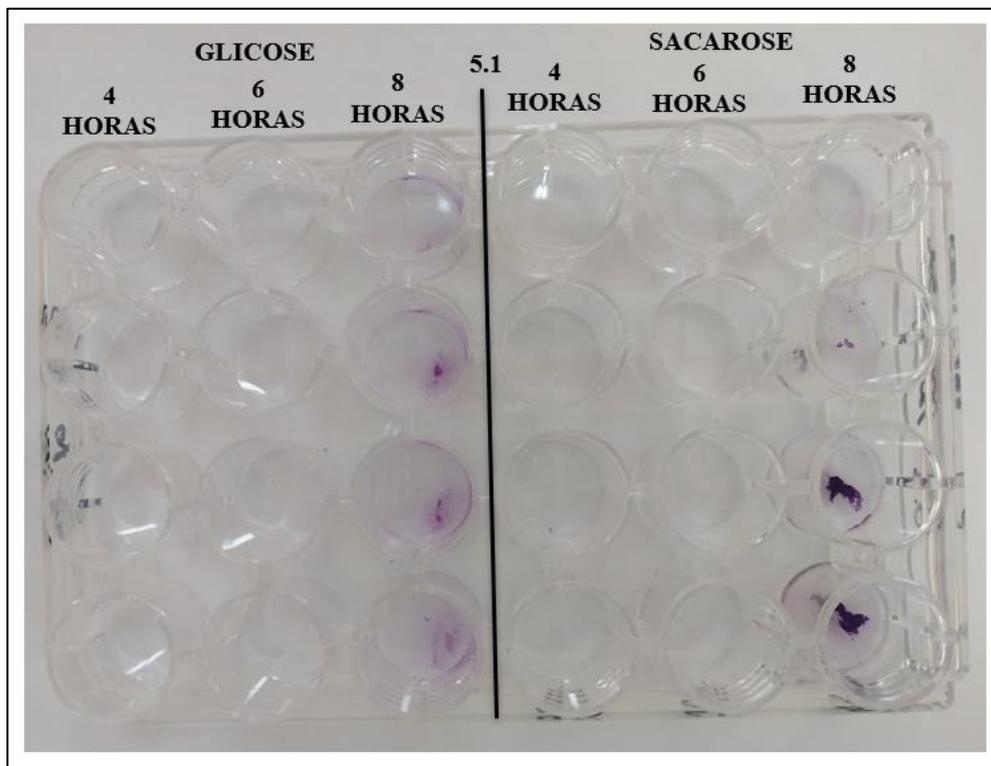


Figura 6 - Coloração com cristal violeta referente ao crescimento de 5.1 em glicose e sacarose.

glicose e sacarose.

4.6 Caracterização eletroforética:

Na Figura 7 observamos o padrão eletroforético produzido pelas linhagens mutantes em comparação com a linhagem selvagem. Após crescimento em meio completo suplementado com glicose, a linhagem ATCC apresentou três bandas, com mobilidade relativa de 0,20, 0,25 e 0,42 respectivamente. Já após crescimento em meio completo suplementado com sacarose, a linhagem ATCC apresentou apenas duas bandas, a primeira com mobilidade de 0,20 e a segunda com 0,25. Segundo Thurnheer *et al.*, (2006), as bandas de mobilidade 0,2 e 0,25 correspondem à atividade GTB B e GTF C, respectivamente. A banda de mobilidade 0,42 não foi visualizada por esses autores. O mesmo padrão foi observado para as linhagens mutantes 4.4 e 5.1, conforme mostra a Figura 7.

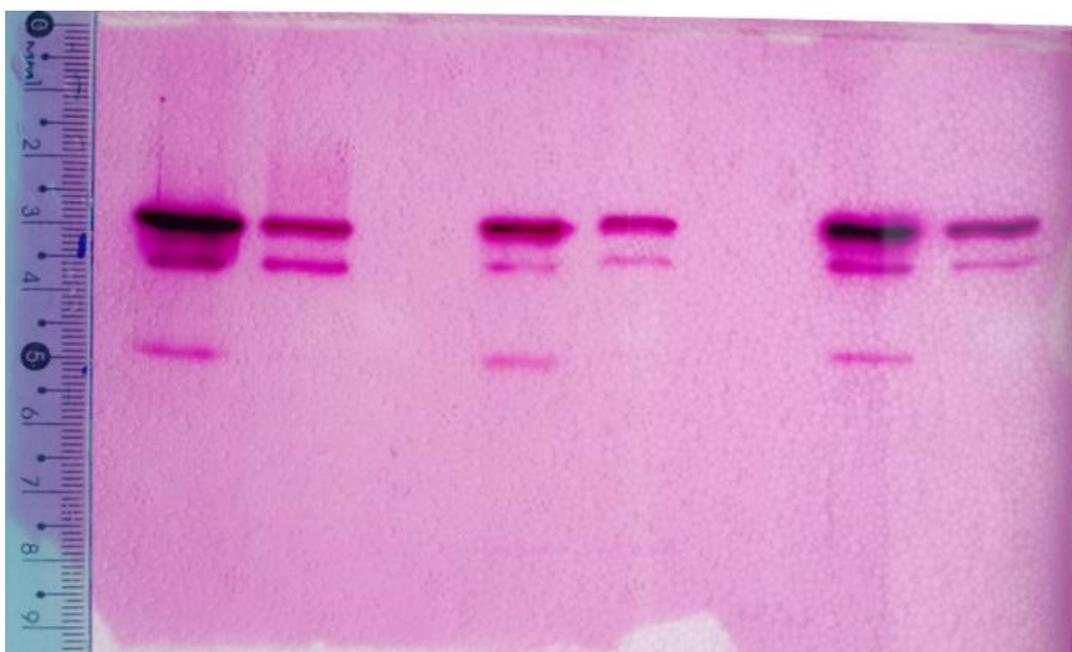


Figura 7 – Padrão de atividade da enzima Glicosiltransferase após eletroforese em gel de poliacrilamida. Da esquerda para a direita, apresenta-se as linhagens ATCC em glicose, ATCC em sacarose, 4,4 em glicose, 4,4 em sacarose, 5,1 em glicose e 5,1 em sacarose. Gel corado com a técnica do Ácido Periódico de Schiff, após a incubação em sacarose.

Como controle, foi realizada a coloração de um gel com as mesmas condições do gel da Figura

7, porém imediatamente após a corrida da eletroforese (sem a incubação overnight com sacarose), utilizando somente a técnica do Ácido Periódico de Schiff. Conforme mostrado na Figura 8, não foram constatadas bandas após a coloração, indicando que as bandas observadas na Figura 7 não se tratam de glicoproteínas, mas sim do produto da atividade GTF no gel.



Figura 8 – Ausência do padrão de atividade após eletroforese em gel de poliacrilamida corado imediatamente após a corrida com a técnica do Ácido Periódico de Schiff.

Foi realizada também a coloração de um gel com Comassie Blue a fim de identificar o padrão eletroforético das proteínas. Conforme a Figura 9, não foi constatada diferença no padrão de proteínas apresentado pelas linhagens mutantes em relação à selvagem, embora haja uma pequena alteração nas proteínas produzidas pelas linhagens crescendo em glicose e sacarose, como indicado na Figura 9.

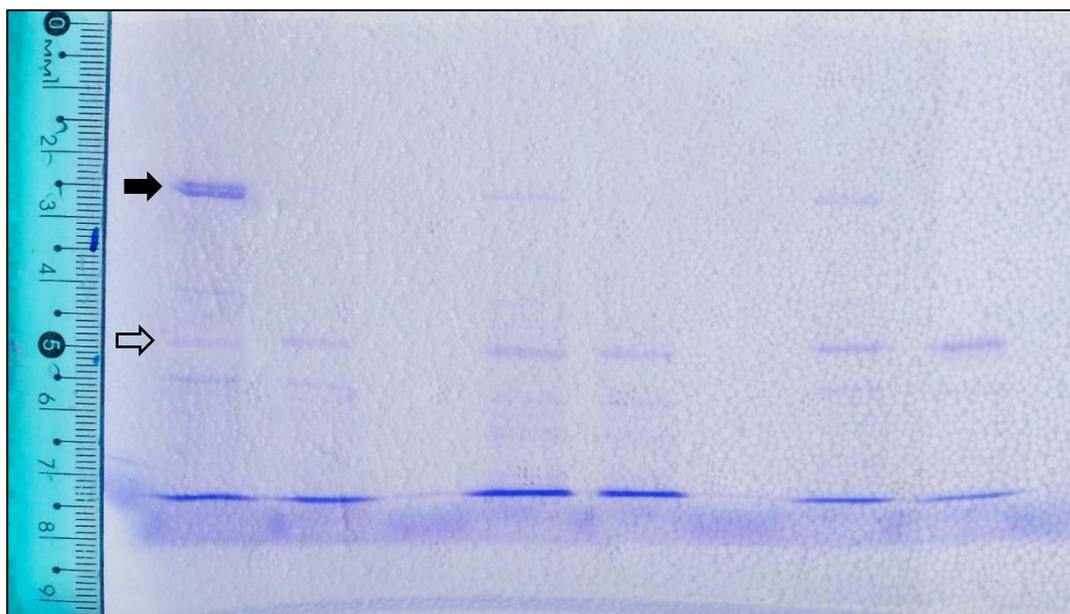


Figura 9 - Padrão eletroforético após coloração com Coomassie Blue. Da esquerda para a direita, apresenta-se as linhagens ATCC em glicose, ATCC em sacarose, 4,4 em glicose, 4,4 em sacarose, 5,1 em glicose e 5,1 em sacarose. A seta cheia indica bandas proteicas cuja expressão é diferente na linhagem selvagem em relação às mutantes. A seta vazia indica proteína cuja quantidade é similar nas 3 linhagens.

As imagens das eletroforeses foram convertidas para escala de cinza e analisadas através do software ImageJ (National Institutes of Health, EUA) para a quantificação das bandas de atividade através de densitometria de imagem. Os dados mostrados na quadro 4 sugerem uma diferença na intensidade das bandas, com maior intensidade das bandas da linhagem selvagem em relação às mutantes após crescimento em sacarose. Se considerarmos que quantidades similares de proteína foram adicionadas em cada raia, os dados sugerem que a linhagem selvagem produz uma atividade GTF superior às mutantes.

Quadro 4 – Quantificação das bandas de atividade através de densitometria de imagem do gel de eletroforese corado com a técnica do Ácido Periódico de Schiff.

Linhagem	ATCC		4.4		5.1		
	Açúcar	Glicose	Sacarose	Glicose	Sacarose	Glicose	Sacarose
1ª banda (GTF B)		13216,075	5840,752	7370,690	3809,690	11320,924	3154,388
2ª banda (GTF C)		8045,530	5106,530	4622,054	1693,912	11462,761	1120,004
3ª banda		5415,451	-	4114,539	-	4706,640	-

4.7 Identificação das linhagens mutantes por PCR

Após extração do DNA das 3 linhagens (Figura 9) foi realizado o PCR das 3 linhagens utilizando-se primers para os genes *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *fff*, *VicX* e *VicR*. Observa-se que as 3 linhagens amplificaram todos os genes de maneira similar (Figura 10), confirmando a identidade genética dos mutantes em relação à linhagem ATCC.

Figura 10 – Eletroforese das amostras de DNA extraídos das linhagens ATCC 25175 e mutantes 4.4 e 5.1. No gel: 1 e 2 = selvagem; 3 e 4 = mutante 4.4; 5 e 6 = mutante 5.1.

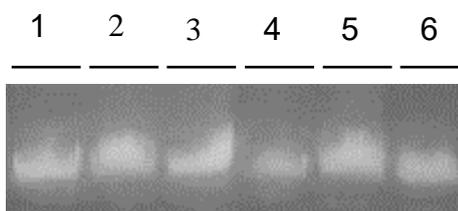
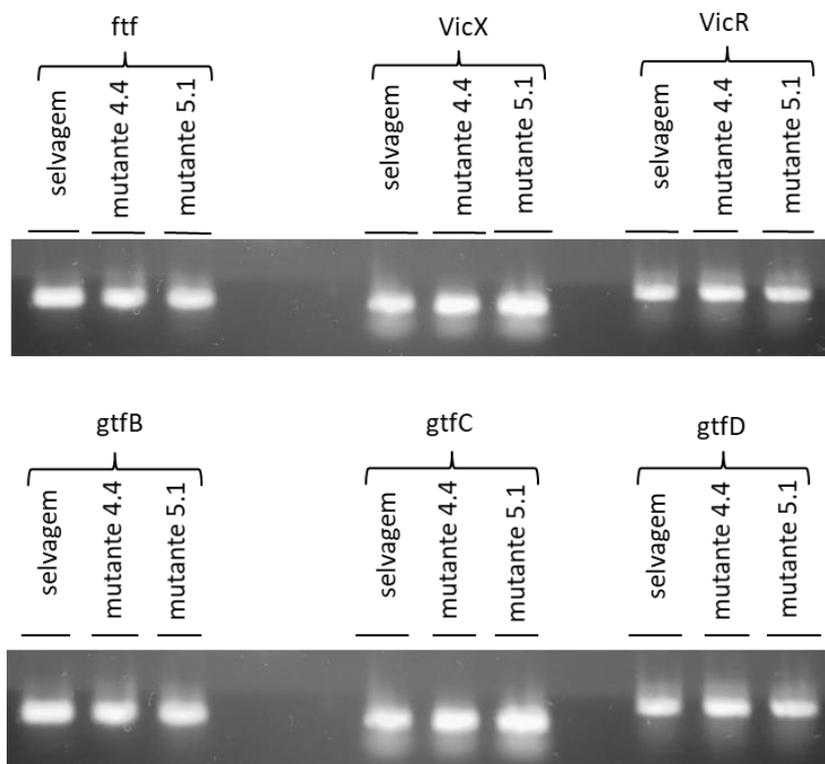


Figura 11 – Eletroforese das reações de PCR realizadas com as linhagens selvagem e mutantes 4.4 e 5.1 para amplificação dos genes *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *ftf*, *VicX* e *VicR*.



5. DISCUSSÃO

A perda dos componentes minerais dos dentes está relacionada ao período em que bactérias que fermentam carboidratos, como o *S. mutans*, podem se desenvolver livremente e sintetizar ácidos como subprodutos do metabolismo de carboidratos. Uma das características de *S. mutans* é a sua capacidade de resistência a valores de pH baixo, o que favorece o avanço do processo cariogênico (KRZYŚCIAK *et al.*, 2013). Em nosso estudo, as duas linhagens mutantes testadas (4.4 e 5.1) acidificaram o pH do meio tanto na presença de glicose como fonte de carbono quanto na presença de sacarose, resultados semelhantes à linhagem selvagem (ATCC 25175).

O *S. mutans* depende exclusivamente da glicólise para gerar energia, e uma característica única desse organismo é sua capacidade de metabolizar uma ampla variedade de carboidratos (LEMOS *et al.*, 2019). Essa bactéria emprega diversas vias para metabolizar a sacarose e produzir ácidos (ZENG; BURNE, 2012), com a participação de várias enzimas tais como as glicosiltransferases (Gtfs) que convertem a sacarose em glucanos, que estimulam a formação de biofilmes, permitindo a adesão celular a superfícies dentárias e a outros microrganismos bucais (BOWEN; KOO, 2011).

A curva de absorvância em 620nm reflete o crescimento da bactéria na forma planctônica, permitindo observar que, durante o crescimento com sacarose como fonte de carbono, as linhagens mutantes apresentam um crescimento planctônico superior à linhagem selvagem, sugerindo menor formação de biofilme pelos mutantes e, conseqüentemente, a presença de maior quantidade de bactérias crescendo em suspensão, sugerindo que os mutantes apresentam menor capacidade de formação de biofilme. Em estudos com bactérias cultivadas planctonicamente, Hanada *et al.* (1988) investigou linhagens mutantes que apresentavam defeitos no Gtf C, apresentando mudanças cruciais em sua capacidade de crescer na presença de sacarose. Já em meio suplementado com glicose, no nosso estudo, o crescimento planctônico foi similar para as três linhagens, sugerindo que o metabolismo da glicose não está alterado nos mutantes.

O resultado da curva de absorvância em 550nm reflete a formação de biofilme, onde foi demonstrado que a linhagem ATCC 25175 tem maior capacidade de adesão ao substrato do que as outras duas linhagens, inclusive quando a fonte de carbono é a sacarose, refletindo assim sua maior capacidade de formação de biofilme, como já foi observado na literatura anteriormente (KRZYŚCIAK *et al.*, 2013).

Ainda em relação à formação do biofilme, foi observado que a linhagem ATCC formou mais biofilme em meios suplementados com sacarose do que em meios suplementados com glicose, como é o esperado, uma vez que a sacarose é o substrato da enzima glicosiltransferase, responsável pela formação dos glucanos que permitem a adesividade da bactéria ao substrato (BOWEN; KOO, 2011). Ambas as linhagens mutantes parecem ter dificuldades tanto em se aderir às superfícies quanto na produção de um biofilme eficaz, esse resultado sugere uma menor formação de glucanos.

Apesar do crescimento na forma planctônica ter sido maior nos mutantes do que na linhagem ATCC, e a formação de biofilme ter sido menor nas linhagens mutantes quando comparadas ao selvagem, não foi observada diferença significativa na acidificação do meio de cultura entre as três linhagens, independentemente da fonte de carbono empregada (glicose ou sacarose). A capacidade de acidificar o meio através do metabolismo do substrato é uma das principais características de virulência do *S. mutans* e se mantém preservado nos mutantes (XIAO *et al.*, 2012).

Tal observação sugere que o metabolismo energético não está alterado nos mutantes em comparação com a linhagem selvagem (THURNHEER *et al.*, 2006). Além disso, podemos afirmar que o crescimento predominantemente na forma planctônica ou predominantemente na forma de biofilme não afeta o metabolismo energético, visto que a acidificação do meio é similar quando o crescimento é predominantemente planctônico ou em biofilme. Além disso, podemos afirmar que não há diferença na capacidade acidogênica em função da fonte de carbono ser a glicose ou a sacarose, tendo em vista que as linhagens acidificaram o meio de cultura de maneira semelhante independente da fonte de carboidrato.

Há uma nítida diferença no aspecto macroscópico das colônias da linhagem selvagem quando crescidas em glicose ou sacarose como fonte de carbono, conforme mostrado na figura 1. Essa diferença macroscópica é mais evidente ainda quando se analisa o biofilme formado por essa linhagem em microscopia eletrônica de varredura (Figuras 2 e 3). Com essa metodologia, pudemos observar que o carboidrato disponível interfere muito na morfologia do biofilme, conforme descrito anteriormente (KRETH; KOO; DIAZ, 2022), sugerindo que os glucanos extracelulares gerados em maior abundância quando a sacarose é a fonte de carbono disponível promovem uma maior agregação das células gerando os aglomerados observados na figura 2.

Já os mutantes não apresentaram nem o aspecto macroscópico rugoso e nem o microscópico em grumos observado na linhagem ATCC crescendo em sacarose como fonte de carbono, sugerindo que algum componente do processo de formação do biofilme está comprometido nesses mutantes.

Em estudos anteriores, Okahashi *et al.* (1984) investigou a composição de polissacarídeos produzidos por uma linhagem de *S. mutans* que crescia em colônias com morfologia não usual, constatando que a atividade de frutossiltransferase aumentada e a morfologia colonial única desta linhagem se deviam a produção de quantidades elevadas de frutanos.

No nosso estudo, quando as três linhagens são observadas em maior aumento na MEV, não se observou diferença evidente no formato das células nem das cadeias celulares, sugerindo que a alteração dos mutantes não afetou a morfologia celular, mas apenas sua capacidade de formação de biofilme.

Durante a caracterização eletroforética, foi detectada a atividade de Gtf B, Gtf C em glicose e sacarose de forma semelhante à encontrada por Thurnheer *et al.* (2006) tanto para a linhagem selvagem quanto para as mutantes, e a presença da atividade de uma terceira banda não identificada por esses autores, provavelmente pelo método empregado na visualização da atividade, menos sensível do que a colocação com o Ácido Periódico de Schiff empregado neste estudo. A terceira banda só foi identificada após crescimento em sacarose para as três linhagens. O fato dos mutantes e selvagem terem o mesmo padrão de atividade enzimática após a eletroforese sugere que o problema não reside na expressão dos genes *gtfB*, *gtfC*, cujo produto se observa pela metodologia empregada, embora não se descarte que a quantidade dos produtos gênicos (proteínas GTB B e GTF C) possa estar alterada, como sugere a atividade enzimática após eletroforese (Figura 7). Os resultados também não excluem a possibilidade de outros genes envolvidos na formação do biofilme estarem afetados.

Numa busca preliminar, tanto a linhagem selvagem quanto os mutantes revelaram possuir os genes *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *fff*, *VicX* e *VicR* (figura 10), o que não exclui a possibilidade de que os mutantes apresentem uma alteração menor nos genes, como uma troca de bases, uma deleção pequena ou outra alteração fora da área amplificada pelos primers utilizados, que comprometa o processo de formação de biofilme.

Em suma, nossos dados destacam o impacto das glicosiltransferases na estrutura e nas propriedades dos biofilmes. Esses resultados evidenciam nossa compreensão ainda restrita sobre o papel dessas enzimas nos biofilmes e na formação da placa bacteriana, o que demanda uma investigação mais aprofundada sobre a estrutura, composição e características dos biofilmes, genes e enzimas envolvidas no seu processo. Esses estudos, em conjunto, têm o potencial de promover uma abordagem mais abrangente e integrada na avaliação da patogênese da cárie.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nos permitem concluir que as linhagens mutantes com morfologia alterada apresentam metabolismo energético inalterado em relação ao padrão da linhagem ATCC, mas tem seu mecanismo de formação de biofilme alterado, de modo a formar menos biofilme em meios suplementados com sacarose como fonte de carbono apesar do padrão eletroforético e de atividade das enzimas GTF B e GTF C ter sido similar ao padrão da linhagem selvagem.

7. REFERÊNCIAS

ABRANCHES, J.; ZENG, L.; KAJFASZ, J. K.; PALMER, S. R.; CHAKRABORTY, B.; WEN, Z. T.; RICHARDS, V. P.; BRADY, L. J.; LEMOS, J. A.. Biology of Oral Streptococci. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 6, n. 5, 7 set. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018>.

AOKI, H; SHIROZA, T; HAYAKAWA, M; SATO, S; KURAMITSU, H K. Cloning of a Streptococcus mutans glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 587-594, set. 1986. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.53.3.587-594.1986>.

BOWEN, W.H.; KOO, H.. Biology of Streptococcus mutans-Derived Glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000324598>.

CABALÉN, María Belén; MOLINA, Gustavo Fabián; BONO, Alejandra; BURROW, Michael F.. Nonrestorative Caries Treatment: a systematic review update. **International Dental Journal**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 746-764, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.identj.2022.06.022>.

CAUFIELD, Page W.; GRIFFEN, Ann L.. DENTAL CARIES. **Pediatric Clinics Of North America**, [S.L.], v. 47, n. 5, p. 1001-1019, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-3955\(05\)70255-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-3955(05)70255-8).

CHEN, Lulu; REN, Zhi; ZHOU, Xuedong; ZENG, Jumei; ZOU, Jing; LI, Yuqing. Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and virulence by an oxazole derivative. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 100, n. 2, p. 857-867, 3 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7092-1>.

CUI, Tao; LUO, Wenfu; XU, Letong; YANG, Baoqiang; ZHAO, Wen; CANG, Huaixing. Progress of Antimicrobial Discovery Against the Major Cariogenic Pathogen Streptococcus mutans. **Current Issues in Molecular Biology**, [S.L.], p. 601-644, 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.21775/cimb.032.601>.

DEWHIRST, Floyd E.; CHEN, Tuste; IZARD, Jacques; PASTER, Bruce J.; TANNER, Anne C. R.; YU, Wen-Han; LAKSHMANAN, Abirami; WADE, William G.. The Human Oral Microbiome. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 192, n. 19, p. 5002-5017, out. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00542-10>.

EMILSON, C.G.. Potential Efficacy of Chlorhexidine against Mutans Streptococci and Human Dental Caries. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 73, n. 3, p. 682-691, mar. 1994. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345940730031401>.

FEATHERSTONE, J.D.B.. The Continuum of Dental Caries—Evidence for a Dynamic Disease Process. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 39-42, jul. 2004. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910408301s08>.

FEJERSKOV, O.. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: consequences for oral health care. **Caries Research**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 182-191, 2004. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000077753>.

FERRETTI, J J; HUANG, T T; RUSSELL, R R. Sequence analysis of the glucosyltransferase A gene (gtfA) from Streptococcus mutans Ingbritt. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 56, n. 6, p. 1585-1588, jun. 1988. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.56.6.1585-1588.1988>.

FITZGERALD, Robert J.; KEYES, Paul H.. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **The Journal of The American Dental Association**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 9-19, jul. 1960. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.1960.0138>.

GOMEZ, J. Detection and diagnosis of the early caries lesion. **Bmc Oral Health**, [S.L.], v. 15, n. 1, 15 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6831-15-s1-s3>.

HAMADA, Shigeyuki; TAI, S.; SLADE, Hutton D.. Binding of Glucosyltransferase and Glucan Synthesis by Streptococcus mutans and Other Bacteria. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 213-220, jul. 1978. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.21.1.213-220.1978>.

HAMILTON, I. R.; BUCKLEY, N. D.. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. **Oral Microbiology and Immunology**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 65-71, abr, 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302x.1991.tb00453.x>.

HANADA, N; KURAMITSU, H K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 56, n. 8, p. 1999-2005, ago. 1988. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.56.8.1999-2005.1988>.

HASSELL, Thomas M.; HARRIS, Emily L. Genetic Influences in Caries and Periodontal Diseases. **Critical Reviews In Oral Biology & Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 319-342, out. 1995. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/10454411950060040401>.

KAMAREHEI, Farideh; MEHDIABADI, Mohsen; NADERI, Fariba. Antibacterial effects of natural compounds on biofilm formation of *S treptococcus mutans*. **Clinical And Experimental Dental Research**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 1426-1433, 25 out. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cre2.673>.

KIDD, E.A.M.; FEJERSKOV, O.. What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 35-38, jul. 2004. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910408301s07>.

KILIAN, M.; CHAPPLE, I. L. C.; HANNIG, M.; MARSH, P. D.; MEURIC, V.; PEDERSEN, A. M. L.; TONETTI, M. S.; WADE, W. G.; ZAURA, E.. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. **British Dental Journal**, [S.L.], v. 221, n. 10, p. 657-666, nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>.

KRETH, Jens; KOO, Hyun; DIAZ, Patricia I.. The functional oral microbiome: biofilm environment, polymicrobial interactions, and community dynamics. **Molecular Oral Microbiology**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 165-166, 28 set. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/omi.12390>.

KRZYŚCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOŚCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A.. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.L.], v. 33,

n. 4, p. 499-515, 24 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>.

KUTSCH, V. Kim. Dental caries: an updated medical model of risk assessment. **The Journal Of Prosthetic Dentistry**, [S.L.], v. 111, n. 4, p. 280-285, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.07.014>.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [S.L.], v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

LEBEAUX, David; GHIGO, Jean-Marc; BELOIN, Christophe. Biofilm-Related Infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 510-543, set. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00013-14>.

LEI, Lei; YANG, Yingming; MAO, Mengying; LI, Hong; LI, Meng; YANG, Yan; YIN, Jiabin; HU, Tao. Modulation of Biofilm Exopolysaccharides by the Streptococcus mutans vicX Gene. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-6, 21 dez. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01432>.

LEMOS, J.A.; PALMER, S.R.; ZENG, L.; WEN, Z.T.; KAJFASZ, J.K.; FREIRES, I.A.; ABRANCHES, J.; BRADY, L.J.. The Biology of Streptococcus mutans. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 7, n. 1, 8 fev. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>.

LEMOS, José A.; BURNE, Robert A.. A model of efficiency: stress tolerance by streptococcus mutans. **Microbiology**, [S.L.], v. 154, n. 11, p. 3247-3255, 1 nov. 2008. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/023770-0>.

MAGANA, Maria; SERETI, Christina; IOANNIDIS, Anastasios; MITCHELL, Courtney A.; BALL, Anthony R.; MAGIORKINIS, Emmanouil; CHATZIPANAGIOTOU, Stylianos; HAMBLIN, Michael R.; HADJIFRANGISKOU, Maria; TEGOS, George P.. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 31, n. 3, jul. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00084-16>.

MCCABE, R. M.; DONKERSLOOT, J. A.. Adherence of Veillonella Species Mediated by Extracellular Glucosyltransferase from Streptococcus salivarius. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 726-734, dez. 1977. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.18.3.726-734.1977>.

OKAHASHI, N; ASAKAWA, H; KOGA, T; MASUDA, N; HAMADA, S. Clinical isolates of Streptococcus mutans serotype c with altered colony morphology due to fructan synthesis. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 617-622, jun. 1984. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.44.3.617-622.1984>.

PETERSEN, P.e.; KWAN, S.. World Health Organization global oral health strategies for oral health promotion and disease prevention in the twenty-first century. **Prävention Und Gesundheitsförderung**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 100-104, 5 abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11553-009-0169-x>.

PITTS, Nigel B.; TWETMAN, Svante; FISHER, Julian; MARSH, Philip D.. Understanding dental caries as a non-communicable disease. **British Dental Journal**, [S.L.], v. 231, n. 12, p. 749-753, 17 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>.

POZOS-GUILLÉN, Amaury; MOLINA, Gustavo; SOVIERO, Vera; ARTHUR, Rodrigo Alex; CHAVARRIA-BOLAÑOS, Daniel; ACEVEDO, Ana María. Management of dental caries lesions in Latin American and Caribbean countries. **Brazilian Oral Research**, [S.L.], v. 35, n. 1, 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0055>.

RAMOS-GOMEZ, Francisco; WEINTRAUB, Jane; GANSKY, Stuart; HOOVER, Charles; FEATHERSTONE, John. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. **Journal Of Clinical Pediatric Dentistry**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 165-173, 1 jan. 2003. MRE Press. <http://dx.doi.org/10.17796/jcpd.26.2.t6601j3618675326>.

REN, Zhi; CHEN, Lulu; LI, Jiyao; LI, Yuqing. Inhibition of Streptococcus mutans polysaccharide synthesis by molecules targeting glycosyltransferase activity. **Journal Of Oral Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 31095, jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v8.31095>.

SALAMANCA, E.J. Florez; KLEIN, M.I. Extracellular matrix influence in *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm. **Molecular Oral Microbiology**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 181-193, 12 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/omi.12212>.

SCHEIE, Anne Aamdal; PETERSEN, Fernanda Cristina. The Biofilm Concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases?. **Critical Reviews In Oral Biology & Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 4-12, jan. 2004. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/154411130401500102>.

SELWITZ, Robert H; ISMAIL, Amid I; PITTS, Nigel B. Dental caries. *The Lancet*, [S.L.], v. 369, n. 9555, p. 51-59, jan. 2007. **Elsevier BV**. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)60031-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60031-2).

SEOW, W. Kim. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dentistry And Oral Epidemiology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 8-27, out. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0528.1998.tb02090.x>.

SÖDER, Birgitta; YAKOB, Maha; MEURMAN, Jukka H; ANDERSSON, Leif C; SÖDER, Per-Östen. The association of dental plaque with cancer mortality in Sweden. A longitudinal study. **Bmj Open**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 1-2, 2012. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001083>.

THURNHEER, T.; PLOEG, J.R. van Der; GIERTSEN, E.; GUGGENHEIM, B.. Effects of *Streptococcus mutans* gtfC Deficiency on Mixed Oral Biofilms in vitro. **Caries Research**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 163-171, 2006. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000091065>.

TODA, Masayoshi; YAMAGUCHI, Makoto; KATSUNO, Takayuki; IWAGAITSU, Shiho; NOBATA, Hironobu; KINASHI, Hiroshi; BANNO, Shogo; ITO, Yasuhiko. *Streptococcus mutans*-Induced Infective Endocarditis Associated With Hypocomplementemia and Positive Anti-Double-stranded DNA Antibody. *Jcr: Journal of Clinical Rheumatology*, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 15-16, 19 nov. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/rhu.0000000000001205>.

TOUGER-DECKER, Riva; VAN LOVEREN, Cor. Sugars and dental caries. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 78, n. 4, p. 881-892, out. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/78.4.881s>.

VACCA-SMITH, A.M; BOWEN, W.H. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 103-110, abr. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9969\(97\)00111-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9969(97)00111-8).

XIAO, Jin; KLEIN, Marlise I.; FALSETTA, Megan L.; LU, Bingwen; DELAHUNTY, Claire M.; YATES, John R.; HEYDORN, Arne; KOO, Hyun. The Exopolysaccharide Matrix Modulates the Interaction between 3D Architecture and Virulence of a Mixed-Species Oral Biofilm. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 1-2, 5 abr. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002623>.

YU, Ollie Yiru; LAM, Walter Yu-Hang; WONG, Amy Wai-Yee; DUANGTHIP, Duangporn; CHU, Chun-Hung. Nonrestorative Management of Dental Caries. **Dentistry Journal**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 121, 18 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/dj9100121>.

ZACHARIUS, Robert M.; ZELL, Tatiana E.; MORRISON, John H.; WOODLOCK, John J.. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 148-152, jul. 1969. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90383-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(69)90383-2).

ZENG, L.; BURNE, R. A.. Comprehensive Mutational Analysis of Sucrose-Metabolizing Pathways in *Streptococcus mutans* Reveals Novel Roles for the Sucrose Phosphotransferase System Permease. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 195, n. 4, p. 833-843, 7 dez. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.02042-12>.