

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Faculdade de Ciências de Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

Isolamento e construção de cassetes de inativação de genes codificadores de colagenases de *Streptococcus mutans* com possível envolvimento na degradação colagenolítica em Cárie Radicular

Cecília de Brito Barbosa

Brasília, 4 de Novembro de 2020

Cecília de Brito Barbosa

Isolamento e construção de cassetes de inativação de genes codificadores de colagenases de *Streptococcus mutans* com possível envolvimento na degradação colagenolítica em Cárie Radicular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Nailê Damé- Teixeira

Coorientadora: Loise Pedrosa Salles

Brasília, 2020

Cecília de Brito Barbosa

Isolamento e construção de cassetes de inativação de genes codificadores de colagenases de *Streptococcus mutans* com possível envolvimento na degradação colagenolítica em Cárie Radicular

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 4 de Novembro de 2020

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira (Orientadora)

---

Profa. Dra Ana Carolina Acevedo Poppe. (Membro titular)

---

Profa. Dra. Janice Lisboa De Marco (Membro titular)

---

Profa. Dra. Daniela Corrêa Grisi (Suplente)

*Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, por me guiar em direção aos meus sonhos. À minha família, em especial aos meus pais, Clédiston e Marliete, por não pouparem esforços para minha felicidade. Aos meus amados colegas de mestrado, por todo companheirismo. Aos meus amigos, que me incentivaram todos os dias e estiveram sempre ao meu lado. À minha tão querida orientadora, Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira, por todo ensinamento compartilhado com tanta bondade e confiança durante todo o mestrado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele eu nada conseguiria em minha vida. A fé me fez conquistar muito mais do que mereço.

Aos meus pais, que se esforçaram desde sempre, se dedicaram, e, principalmente, abdicaram de muitos sonhos para que eu alcançasse os meus. Minha mãe, por todas as palavras de amor, conforto e colo insubstituível, não só no mestrado, mas durante todos os dias da minha vida. Ao meu pai, que sempre me mostrou o quanto a educação é essencial na vida do ser humano. Espero ser um dia, assim como ele, uma professora tão dedicada e apaixonada pela profissão. Sei que sou muito abençoada pela família que tenho.

Ao meu irmão gêmeo, Matheus, por todo bom humor, paciência e tranquilidade ao me acompanhar nesses anos de mestrado.

Aos meus familiares, por estarem sempre ao meu lado, incentivando-me e apoiando-me nessa jornada.

À Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira, pela maravilhosa orientação, pela paciência, pelo carinho ao ensinar e falar e, principalmente por acreditar em meu trabalho desde o princípio, quando eu, recém-formada, encarei o desafio de entrar no mestrado. Obrigada por confiar em mim e me mostrar todos os dias o quanto sou capaz. Espero trilhar um caminho semelhante ao seu, de trabalho exemplar, feito com tanto amor e dedicação. Obrigada por estar ao meu lado na realização de um sonho.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Loise Salles, por todo seu incentivo e ensinamento, que tornaram possível a realização deste trabalho. Obrigada por me mostrar que meu conhecimento poderia ir além da odontologia.

À técnica de laboratório e amiga, Priscila, por transformar um trabalho em equipe em uma linda amizade. Obrigada por todo tempo dedicado ao meu trabalho e por todos os momentos de alegria e aprendizado que compartilhamos.

Ao técnico de laboratório da Biologia Molecular, José, por toda ajuda e tranquilidade durante os meus dias de trabalho laboratorial.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular, em especial a todos os integrantes do lab 2, que me acolheram com tanto amor e pegaram na minha mão para me ensinar grande parte do que hoje sei de Biologia Molecular. Sou grata a

cada um que cedeu um pedaço do seu tempo para me ajudar, seja em experimentos ou até mesmo com uma palavra de conforto.

O meu agradecimento para Vivis, Chris, Pedro, Vanessa, Catarina, Roberta, Igor, Jacob, Francisco, Carmem, Bárbara, Marina, Júlia e Samantha. Em especial agradeço minhas amigas e brilhantes professoras: Yasmin, Myrna, Luiza e Ana Laura, que muitas vezes abdicaram de seus experimentos para me ensinar ou acalmar. Vocês são grandes inspirações para mim, espero levar essa amizade para além do mestrado.

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe, juntamente com a Profa. Dra. Lídia de Moraes que me apresentaram o universo da Biologia Molecular com tanto entusiasmo e dedicação. Obrigada por me receberem como parte do laboratório e por dedicarem seu tempo ao meu projeto e crescimento profissional.

À Universidade de Brasília e à Faculdade de Ciências da Saúde, que abriram portas para que este sonho se tornasse realidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e à Secretaria do Curso de Pós-Graduação pela colaboração, auxiliando-me nos procedimentos acadêmicos formais.

À Profa. Dra. Soraya Coelho Leal e toda equipe da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela atenção e disponibilidade.

Às Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco, Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe - e Profa. Dra. Daniela Corrêa Grisi - por aceitarem o convite para compor a banca examinadora da dissertação.

À Profa. Dra. Heliana Dantas Mestrinho pelos ensinamentos, desde o início da graduação, ao me apresentar o mundo da pesquisa científica. A partir de então, tenho traçado um caminho de dedicação e amor pela ciência. A senhora, sem dúvidas, tem uma grande colaboração na minha formação.

Às minhas colegas de mestrado, e amigas, especialmente, Rafa, Camila, Giulia, Marta e Raquel pela parceria e todos os momentos de alegria compartilhados.

Aos meus queridos amigos Patrícia e Fábio, por caminharem ao meu lado nesses anos, por todas as palavras de amor e conforto. Tenho certeza que nossa amizade percorrerá por longos anos, se Deus quiser.

À aluna de iniciação científica e amiga, Isabela Monici, por ter acompanhado de perto essa jornada e compartilhado momentos de muito aprendizado e alegria.

Ao amigo Carlos Alexandre, que alegra meus dias desde a graduação e entrou comigo no desafio de cursar um mestrado logo após nossa formatura. Agradeço por cada sorriso e cada choro compartilhado. Os amigos são o grande tesouro da vida do ser humano, e você, sem dúvidas, tem valor imensurável para mim.

À CAPES, pelo financiamento ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e por me dar a oportunidade de ser bolsista.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse vencer mais essa etapa. Meus sinceros agradecimentos.

Ser mestre é um sonho antigo e me emociona saber que estou tão perto.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem sucedidos”.

Provérbios 16:3



## RESUMO

A função das bactérias no estágio de desmineralização do desenvolvimento de cárie é bem conhecida. Porém, sabe-se muito pouco de sua função na fase de degradação da matriz colagenolítica. Tendo em vista o pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo, o estudo constitui a investigação biomolecular acerca da atividade de proteases em lesões cariosas radiculares. O objetivo foi realizar uma manipulação genética de duas collagenases putativas do *Streptococcus mutans* UA159, codificadas pelos genes SMU\_761 e SMU\_759 (família PrtC - peptidase U32), capazes de degradar colágeno tipo I, possivelmente envolvidas no processo de degradação da matriz colagenolítica em lesões cariosas radiculares. Para isto, colônias de *S. mutans* UA159 foram cultivadas em ágar BHI, por 18h, a 37°C em microaerofilia. *Primers* específicos para os genes alvo foram desenhados para isolamento por PCR das regiões codantes de interesse (SMU\_761 e SMU\_759). Os isolados foram clonados no vetor pGEM®-T (Promega) e analisados por digestão com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI. Uma segunda PCR com *primers* de sítios BamHI e EcoRI foi necessária para o gene SMU\_759. A análise dos amplicons revelou tamanhos esperados dos genes SMU\_761 (1287pb) e SMU\_759 (927 pb) no gel de eletroforese. Uma segunda clonagem foi realizada em plasmídeo denominado pSC, também digerido com as enzimas da primeira clonagem, derivado do plasmídeo altamente sensível à temperatura pHY304, com intuito de paralisar ou inativar as collagenases estudadas. A clonagem e análises de restrição confirmaram a expressão dos genes alvos. Conclui-se que os genes SMU\_759 e SMU\_761 são de fácil manipulação. Sugerimos, porém, que pode haver importância no genoma pela dificuldade de transformação no *S. mutans*. As perspectivas desse estudo consideram a transformação e teste dos mutantes com as collagenases inativadas para avaliar se existe influência na formação de lesões cariosas radiculares. Os resultados são essenciais para futura confirmação da função colagenolítica e cariogenicidade em lesões radiculares.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cárie radicular; *Streptococcus mutans*; clonagem; transformação; collagenases; peptidases U32.

## ABSTRACT

The role of bacteria in the demineralization stage of caries development is well established. However, little is known about its function in the collagenolytic matrix degradation stage. Due to the lack knowledge about the molecular mechanisms involved in this process, this study constitutes a biomolecular investigation on the activity of proteases in root caries lesions. The aim was to genetically manipulate two putative collagenases of the *Streptococcus mutans* UA159, encoded by the SMU\_761 and SMU\_759 genes (PrtC family - peptidase U32), capable of degrading type I collagen and possibly involved in the degradation process of the collagenolytic matrix in root caries lesions. Colonies of *S. mutans* UA159 were grown on BHI agar, for 18h, at 37°C in microaerophilia. Specific primers for the target genes were designed for PCR isolation of the coding regions of interest (SMU\_761 and SMU\_759. The amplicons were analysed on a 1% agarose gel, cloned in the vector pGEM®-T (Promega), and, then, analysed by digestion with the restriction enzymes EcoRI and BamHI. A second PCR with primers from BamHI and EcoRI sites was required for the SMU\_759 gene. An analysis of the amplicons revealed expected sizes of the SMU\_761 (1287bp) and SMU\_759 (927bp) genes in the electrophoresis gel. A second cloning was performed on a plasmid pSC, also digested with the enzymes of the first cloning, derived from the plasmid highly sensitive to temperature pHY304, in order to interrupt or inactivate the studied collagenases. Cloning and restriction analyzes confirmed the expression of the target genes. It can be concluded that the SMU\_759 and SMU\_761 genes are easy to manipulate. We suggest, however, an importance of those genes in the genome due to the struggling transformation. In our perspectives, a transformation and testing of mutants with inactivated collagenases will be performed to assess whether there is an influence on the development of root caries lesions. These results are essential for further confirmation of collagenolytic function and cariogenicity in root surfaces.

**PALAVRAS-CHAVE:** Root Caries; *Streptococcus mutans*; transformation; cloning; collagenases; U32 peptidases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

<b>Quadro 1-</b> Sequências de proteínas e gene alvo (fonte: ncbi) .....	32
<b>Figura 1-</b> Estrutura molecular dos colágenos fibrilares com os vários subdomínios, bem como os locais de clivagem das N- e C-procollagenases.....	39
<b>Figura 2 -</b> . Disposição das fibrilas colágenas.....	40
<b>Figura 3 -</b> Classificação das metaloproteinases.. ..	40
<b>Figura 4 -</b> Contexto dos genes de collagenase no genoma do <i>Streptococcus mutans</i> UA159. Fonte: <a href="https://biocyc.org/SMUT210007">https://biocyc.org/SMUT210007</a> . .....	41

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1 -</b> Fluxograma com a descrição da estratégia de clonagem.....	55
<b>Tabela 1 -</b> Oligonucleotídeos utilizados como <i>primers</i> neste trabalho.....	56
<b>Tabela 2 -</b> Vetores utilizados para clonagem e inativação das collagenases .....	56
<b>Figura 2 -</b> Mapa do vetor pGEM®-T utilizado no trabalho.....	58
<b>Figura 3 -</b> Seleção de clones azul e branco.....	59
<b>Figura 4 -</b> Mapa do vetor pSC utilizado no trabalho. Cedido por: Dr. S.H. Leppla e Dr. A.P. Pomerantsev (NIH/NIAID)....	60

<b>Figura 5</b> - Gel de eletroforese referente à amplificação por PCR do gene SMU_761.....	61
<b>Figura 6</b> - Gel de eletroforese referente à amplificação por PCR do gene SMU_759.....	62
<b>Figura 7</b> - Gel de eletroforese referente à amplificação por PCR do gene SMU_759 com sítios de restrição BamHI e EcoRI... ..	63
<b>Figura 8</b> - Plasmídeo resultante da inserção do fragmento de colagenase SMU_761 no vetor pGEM®-T(A) e da inserção do fragmento de colagenase SMU_759 no vetor pGEM®-T(B).....	63/64
<b>Figura 9</b> - Gel de eletroforese referente à digestão do vetor pSC e do vetor pGEM®-T SMU_761.....	65
<b>Figura 10</b> - Gel de eletroforese referente digestão dos vetores formados no trabalho: pSC SMU_761 e pSC SMU_759.....	66
<b>Figura 11</b> - Plasmídeo resultante da inserção do fragmento de colagenase SMU_761 (A) e SMU_759 (B) no vetor pSC. ....	66
<b>Figura 12</b> - Placas representativas do protocolo de transformação em <i>S. mutans</i> .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Tratamento restaurador atraumático
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de cálcio
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hidroxiapatita de cálcio
CaF <sub>2</sub>	Fluoreto de cálcio
Ca	Cálcio
CO <sub>3</sub>	Carbonato
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
P04	Fosfato
Mg	Magnésio
Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Fosfato de magnésio
MMPs	Metaloproteinases da matriz
PCR	Reação em cadeia da polymerase
Ppm F	Partes por milhão
<i>S.mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TIMPs	Inibidores teciduais de MMPs

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS</b> .....	16
1.1 INTRODUÇÃO .....	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
1.2.1 Cárie radicular e a importância do estudo da doença na odontologia atual .....	17
1.2.1.1 Aspectos clínicos e os problemas relacionados aos tratamentos disponíveis para cárie radicular .....	19
1.2.2 Composição dos tecidos dentários duros e cárie radicular .....	24
1.2.3 Formação das lesões cariosas radiculares: fases de desmineralização e degradação da matriz colagenolítica .....	26
1.2.3.1 Ação de proteases na degradação da matriz colagenolítica .....	28
1.2.3.2 Metaloproteinases nos tecidos do hospedeiro .....	28
1.2.3.3 Colagenases e cárie radicular .....	30
1.2.4 Papel das bactérias, especialmente o <i>Streptococcus mutans</i> e formação do biofilme dentário radicular .....	35
1.2.5 Características da bactéria <i>Streptococcus mutans</i> e manipulação do seu genoma .....	36
1.2.6 Princípios básicos da clonagem molecular e do DNA recombinante .....	38
1.3. Objetivos e justificativa .....	42
1.3.1 Objetivo Geral .....	42
1.3.2 Objetivos específicos .....	42
1.3.3 Justificativa .....	42
1.4 REFERÊNCIAS .....	43
<b>CAPÍTULO 2 – CONSTRUÇÃO DE CASSETES PARA INATIVAÇÃO DE GENES QUE EXPRESSAM COLAGENASES PUTATIVAS DE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> UA159 EM CÁRIE RADICULAR</b> .....	53
2.1 INTRODUÇÃO .....	53
2.2 MÉTODOS .....	55
2.2.1 Estratégia .....	55
2.2.1.1 Origem do microrganismo e extração do DNA genômico .....	55
2.2.1.2 Amplificação dos genes de interesse .....	56
2.2.2 Clonagem no vetor pGEM®-T .....	57
2.2.3 Clonagem no vetor pSC .....	59

2.2.3.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição .....	59
2.3 RESULTADOS.....	61
2.3.1 Amplificação dos genes de interesse .....	61
2.3.2 Clonagem no vetor pGEM®-T .....	63
2.3.2.1 Confirmação da clonagem do fragmento no vetor pGEM®-T por digestão com enzimas de restrição .....	64
2.3.3 Clonagem no vetor pSC .....	65
2.3.3.1 Confirmação da clonagem dos fragmentos no vetor pSC por digestão com enzimas de restrição .....	65
2.3.4 Transformação em <i>Streptococcus mutans</i> .....	67
2.4 DISCUSSÃO .....	68
2.5 REFERÊNCIAS.....	70
<b>CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>73</b>
3.1 DISCUSSÃO GERAL.....	73
3.2 CONCLUSÕES.....	75
<b>CAPÍTULO 4 – PRESS RELEASE .....</b>	<b>76</b>

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

### 1.1 INTRODUÇÃO

Junto ao envelhecimento da população mundial, os padrões de higiene e o conhecimento sobre patologias bucais como a doença cárie estão melhorando, fato que resulta em mais dentes retidos, mesmo em pacientes idosos (Griffin, Griffin et al. 2004). No entanto, uma condição vista frequentemente nesses pacientes é a presença de cárie radicular (Takahashi and Nyvad 2016). O desenvolvimento e a progressão das lesões cariosas radiculares ainda não foram totalmente esclarecidos, mas muitos estudos buscam conhecer os mecanismos envolvidos nesse processo (Takahashi and Nyvad 2011, Heasman, Ritchie et al. 2017). Isso porque, apesar da função das bactérias no estágio de desmineralização ser bem conhecida, pouco se sabe de sua função na fase de degradação da matriz colagenolítica, principalmente sobre a ação de proteases na formação de lesões de cárie radicular (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018).

O estudo da bactéria *Streptococcus mutans*, importante agente patobionte na cárie dentária, permitiu a descoberta dos inúmeros fatores de virulência desse microrganismo e sua ação em diversas doenças bucais, consolidando o *S. mutans* como membro importante da microbiota indígena e presente no desenvolvimento de lesões de cárie, inclusive radiculares (Ellen, Banting et al. 1985, Bowden, Ekstrand et al. 1990, Nyvad and Fejerskov 1990). Com essa conquista, pesquisadores também foram capazes de demonstrar que proteases de *S. mutans* podem contribuir para a virulência da bactéria em cárie radicular a partir da quebra das proteínas e degradação da matriz de colágeno durante a progressão da doença (Ajdic, McShan et al. 2002, Dame-Teixeira, Parolo et al. 2016, Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018). A superexpressão de genes relacionados à atividade proteolítica e colagenases em lesões de cárie radicular também sugere a importância no genoma de *S. mutans* (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018).



A cepa UA159 possui inúmeras proteases, dentre elas, encontra-se duas proteases relacionadas à atividade colagenolítica (SMU\_759 e SMU\_761) que podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da doença cárie. Esse papel da degradação do colágeno em lesões radiculares está, normalmente, relacionado com proteínas da matriz dentinária. Portanto, após revisar a literatura acerca de cárie radicular, objetivou-se entender essa relação entre proteases bacterianas de *S. mutans* no estabelecimento da doença. Serão apresentados dois capítulos, sendo o primeiro a revisão de literatura, e o segundo, o artigo científico originado pela pesquisa laboratorial, baseada em técnicas de engenharia genética bacteriana, dando início a tal linha de pesquisa.

Ao final, será apresentado um *press release*, comunicando os resultados da dissertação a um leitor que não seja da área odontológica, a fim de que seja possível entender o conceito de cárie radicular e a importância de proteases de *S. mutans* no desenvolvimento da doença.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Cárie radicular e a importância do estudo da doença na odontologia atual

As alterações demográficas resultaram em um número crescente de idosos na população. Isso significa que uma média de dois bilhões de pessoas terá 60 anos ou mais em 2050 (Kandelman, Petersen et al. 2008, World Health Organization 2002, Paim, Travassos et al. 2011). Essa transição demográfica é um fenômeno mundial que tem como resultado o aumento da expectativa de vida devido a melhorias nos cuidados de saúde com o passar dos anos (Christensen, Doblhammer et al. 2009).

Mudanças observadas no comportamento e perfil de saúde da população idosa, no que diz respeito à saúde bucal, provocaram um aumento na retenção de dentes na boca com o avanço da idade (Petersen and Yamamoto 2005), acompanhado por um processo natural de recessão gengival, resultando no aumento do número de superfícies radiculares expostas. Esse é um fator de risco para o desenvolvimento da cárie radicular

(Do, Damé-Teixeira et al. 2017, Lopez, Smith et al. 2017). Levantamentos epidemiológicos do SB Brasil, uma pesquisa Nacional de Saúde Bucal, apontam uma considerável diminuição de dentes perdidos na faixa etária de 35 a 44 anos, de 11,6 em 2003, para 6,7 em 2010 (SB Brasil, 2003, SB Brasil, 2010). Em 2013, um estudo mostrou que mais de 50% dos brasileiros idosos são totalmente desdentados, mas cerca de 20% dos que ainda tem pelo menos um dente na boca apresentam cárie radicular (Peres, Barbato et al. 2013).

Outros fatores foram associados à presença da doença em pessoas idosas, incluindo características biológicas e socioeconômicas, como a presença concomitante de lesões de cárie coronária, escolaridade, renda e localização do município (Manji and Fejerskov 1990, Mamai-Homata, Topitsoglou et al. 2012). Na Grécia, pesquisadores encontraram como fatores, o nível educacional, a condição socioeconômica e o sexo (Mamai-Homata, Topitsoglou et al. 2012). No Japão, a condição periodontal e a xerostomia autorrelatada estavam associadas à presença de cárie radicular em idosos, de acordo com a pesquisa de Sugihara e *colaboradores* (Sugihara, Maki et al. 2010).

Estudos demonstraram que a cárie radicular não é um problema isolado, mas sim um agravo com resultados divergentes de prevalência ao longo dos anos (Kim, Baker et al. 2012, Locker and Leake 1993, Gao, Hu et al. 2018). Os diferentes números encontrados mostram que, apesar do aumento da expectativa de vida em nível mundial e da maior taxa de manutenção dos dentes em boca, estimar a prevalência e incidência de cárie radicular ainda pode ser um desafio, uma vez que os dados e os critérios diagnósticos diferem entre os estudos. Diante da falta de consenso sobre a mensuração de cárie radicular e o debate considerável sobre a melhor forma de medi-la, pode-se ver quão complicado é a epidemiologia desta doença (Hayes, Burke et al. 2017).

Uma revisão sistemática realizada por Hariyani e *colaboradores*, mostrou que, apesar da presença dos vieses metodológicos em pesquisas epidemiológicas, um aumento da incidência de lesões cáries radiculares, com o passar dos anos, parece estar presente mesmo em idosos saudáveis (Hariyani, Setyowati et al. 2018). Esses dados confirmam a doença cárie radicular como um agravo bucal em progresso, mas mostram a limitação de estimar uma prevalência e incidência exata em nível mundial devido a

heterogeneidade dos estudos em cada país. De qualquer modo, deve ser estudada a fim de compreender a etiologia e progressão da doença. Isso possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias para tratar lesões cariosas radiculares, visto que ainda não existe um consenso sobre o melhor tratamento do ponto de vista clínico e epidemiológico (Wierichs and Meyer-Lueckel 2015, Meyer-Lueckel, Machiulskiene et al. 2019).

#### 1.2.1.1 Aspectos clínicos e os problemas relacionados aos tratamentos disponíveis para cárie radicular

O aumento de recessão gengival e a consequente exposição radicular associada às lesões cariosas são condições facilmente encontradas em pacientes idosos (Hoppenbrouwers, Driessens et al. 1986, Damé-Teixeira, Parolo et al. 2017). A partir do momento que raízes dentárias ficam expostas ao ambiente oral, tornam-se fragilizadas e suscetíveis à lesões de cárie diante da baixa resistência ao desafio cariogênico se comparadas ao esmalte (Hoppenbrouwers, Driessens et al. 1986, Damé-Teixeira, Parolo et al. 2017). Com o aumento de cárie radicular nessa população, o tratamento dessas lesões ainda não foi padronizado, tornando-se uma dificuldade para os clínicos que muitas vezes não conseguem sucesso com abordagens restauradoras convencionais (Lopez, Smith et al. 2017).

Um dos grandes problemas da doença tem relação com o desafio clínico para seu tratamento. A restauração de lesões de cárie radicular apresenta várias adversidades operacionais, incluindo dificuldades no controle da umidade e na adesão à dentina como o único substrato a aderir (Gostemeyer, da Mata et al. 2019). As características distintas, como a considerável quantidade de material orgânico em dentina e cimento, indicam que o manejo dessas lesões, muitas vezes, não segue o mesmo protocolo aplicado em superfícies coronárias (Burrow and Stacey 2017, Do, Damé-Teixeira et al. 2017). Frequentemente, o local da restauração é contaminado e o formato da cavidade tem propagação lateral maior que em profundidade, ou seja, são lesões amplas e, na maioria das vezes, rasas. Além disso, a curvatura da raiz e

os bordos indefinidos da cavidade dificultam a colocação e o acabamento da restauração (Smith, Preston et al. 2005, Burrow and Stacey 2017).

Lesões radiculares, cavitadas ou não, podem ser inativadas através da aplicação de tratamento não invasivo, entre os quais o uso de fluoreto juntamente com o controle mecânico do biofilme tem sido o mais estudado e eficaz (Fure and Lingstrom 2009). Para técnicas de controle da doença, apesar de existirem estudos acerca de abordagens não invasivas, micro e invasivas, os resultados em geral são inconclusivos para alguns desses métodos quanto à aplicabilidade clínica (Wierichs and Meyer-Lueckel 2015). Estudos de alta relevância científica, como as revisões sistemáticas de Wierichs e Meyer-Lueckel, apontam para o uso de dentifrícios contendo 5.000 ppm F<sup>-</sup>, bem como o verniz de clorexidina aplicado profissionalmente, como efetivos métodos no controle de lesões radiculares, sendo o primeiro citado com alto nível de evidência (Meyer-Lueckel and Paris 2016, Meyer-Lueckel, Machiulskiene et al. 2019).

Ao tratar lesões cariosas radiculares é indispensável orientar a limpeza mecânica diária correta associada ao uso de dentifrício fluoretado, permitindo tratar de forma não invasiva raízes dentárias cariadas (Nyvad, ten Cate et al. 1997, Kidd, Fejerskov et al. 2015). Além disso, o controle do consumo de açúcares é fundamental, visto que alguns tipos de carboidratos seguros para o esmalte são cariogênicos para as superfícies radiculares, que são bioquimicamente mais vulneráveis à presença de ácidos. Observa-se isso através do pH crítico para início da dissolução do esmalte, que é de 5,5, enquanto na dentina esse valor é em torno de 6,3 (Lingström and Birkhed 1994, Aires, Tabchoury et al. 2002, Botelho, Villegas-Salinas et al. 2016).

Somado a essas medidas, comuns a qualquer paciente cárie ativo, algumas evidências para tratamentos não-invasivos de cárie radicular existem. Como descrito anteriormente, Meyer-Lueckel e Wierichs mostraram que o uso diário de dentifrício contendo 5.000 ppm F<sup>-</sup> é mais efetivo se comparado a dentifrícios com 1.000 -1.500 ppm F<sup>-</sup> no controle de lesões cariosas radiculares (Wierichs and Meyer-Lueckel 2015, Meyer-Lueckel, Machiulskiene et al. 2019). Indicou-se também o uso de dentifrícios que contenham 1,5% de arginina mais 1.450 ppm F<sup>-</sup> para inativação das lesões, mas o nível de evidência é muito baixo para haver aplicabilidade clínica. Na forma de verniz, contendo 22.500

ppm F<sup>-</sup> e aplicado a cada três meses, parece contribuir na redução de lesões radiculares de maneira mais eficaz e inativá-las significativamente (Meyer-Lueckel, Machiulskiene et al. 2019).

Entretanto, diferentes pontos de vista são encontrados na literatura a respeito de fluoretos associados a cárie radicular. Metodologias questionáveis e pouco padronizadas apontam a dificuldade de estabelecer um protocolo com diamino fluoreto de prata (SDF), fluoreto de estanho e fluoreto de amina, considerados terapias não-invasivas. Mas, se usados como única alternativa, não exercem grande influência na paralisação do processo carioso, uma vez que outros fatores, como o controle de açúcares dietéticos, tem papel indispensável no controle da doença (Takahashi and Nyvad 2008, Wierichs and Meyer-Lueckel 2015). É importante ressaltar que estudos sobre tratamento com SDF, além de possuírem alto risco de viés, indicam desvantagens estéticas importantes com relação ao uso desse material, no qual a aplicação resulta na coloração escura da região (Wierichs and Meyer-Lueckel 2015, Li, Lo et al. 2016).

A incorporação de clorexidina, principalmente dos vernizes (1% ou 10%) no controle da doença é comum e bem descrita quando falamos em cárie coronária. Para cárie radicular, o número de estudos bem desenhados e sem vieses ainda é pequeno (Meyer-Lueckel and Paris 2016). Em um ensaio clínico duplo cego realizado por Baca, apesar das limitações científicas, foi estabelecido que esse agente tem capacidade de penetrar, selar túbulos dentinários e reduzir os níveis de *S. mutans* na placa de superfícies radiculares expostas (Baca, Clavero et al. 2009). Além disso, a clorexidina usada na odontologia foi recentemente associada a uma possível relação com resistência antimicrobiana, fato que em longo prazo pode ter consequências negativas no controle de infecções bucais (Cieplik, Jakubovics et al. 2019).

Outra possibilidade de tratamento refere-se ao uso de selantes associados ou não a fluoreto de amina, porém não teve nenhum benefício adicional em comparação ao verniz de clorexidina, e demonstrou ter níveis baixos de retenção. O verniz de clorexidina também mostra ser mais eficaz para deter a doença em comparação com o dentifrício convencional de 1000ppm F<sup>-</sup> (Meyer-Lueckel and Paris 2016, Meyer-Lueckel, Machiulskiene et al. 2019).

Em resumo, a terapia com flúor é, hoje, a maior evidência para controle de lesões de cárie radicular, além de ser de fácil aplicação e ter custo relativamente baixo (Chu, Mei et al. 2010). Ainda assim, os vieses metodológicos são grandes e os resultados dependentes de mudança de hábito do paciente. Em grande parte dos estudos clínicos randomizados, por exemplo, são usados placebos como grupo de comparação, ou aspectos diferentes entre os participantes avaliados são comparados. É sabido que nesse tipo de desenho de pesquisa é indispensável uma caracterização fiel dos participantes, randomização adequada e comparações equivalentes entre eles. Infelizmente, muitos estudos sobre o tratamento de cárie radicular não apresentam tais cuidados metodológicos, e resultados tendenciosos foram detectados em alguns deles. Significa dizer que, apesar das revisões sistemáticas disponíveis, não temos ainda um consenso sobre a melhor terapia em cárie radicular.

Além disso, mesmo preconizando o tratamento não invasivo na maioria dos casos, em lesões de cárie radicular já cavitadas, principalmente na superfície proximal, essas terapias tem baixa eficácia, uma vez que a remoção da placa não pode ser realizada suficientemente (Meyer-Lueckel and Paris 2016). Nesses casos, abordagens como o tratamento restaurador atraumático (ART) ou o tratamento restaurador convencional, possibilitam o controle da atividade cariogênica local, e quando possível, é preferível usar uma combinação de remineralização por agentes não invasivos seguida de intervenção cirúrgica, a fim de minimizar os danos ao tecido dentário radicular (Gostemeyer, da Mata et al. 2019).

Nesses tratamentos que envolvem intervenções maiores, alguns desafios dificultam a execução. Isso, porque grande parte dos pacientes é idosa, podendo ter mobilidade afetada, ter passado por radioterapia (irradiados), com conseqüente xerostomia ou ser sistematicamente comprometido, dependendo de cuidados residenciais de longa duração (Bots-VantSpijker, Vanobbergen et al. 2014). Esses fatores adicionam complexidade ao manejo das lesões e diminuem a taxa de sucesso dos tratamentos (Cruz Gonzalez and Marín Zuluaga 2016, Gostemeyer, da Mata et al. 2019).

Uma opção para minimizar o tempo e facilitar a execução da restauração nesses casos é, também, o tratamento restaurador atraumático (ART). Essa

abordagem pode ser mais aplicável que o tratamento restaurador convencional para pacientes idosos, pois o tecido cariado é removido com instrumentos manuais, muitas vezes sem necessitar de anestesia e, por fim, a cavidade é selada com um material adesivo denominado cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Gostemeyer, da Mata et al. 2019). No entanto, Meyer-Lueckel e colaboradores mostraram altas taxas anuais de falha tanto para o ionômero de vidro, quanto para restaurações com compósitos resionosos convencionais (44 e 17% respectivamente), baseados em um número baixo de estudos prospectivos e com alto risco de viés (Meyer-Lueckel, Machiulskiene et al. 2019).

Esse resultado indica que existem dados insuficientes para definir se existe alguma diferença em relação à longevidade da restauração entre as duas técnicas invasivas (Meyer-Lueckel, Machiulskiene et al. 2019). Mesmo assim, independente da opção restauradora, fatores como controle de contaminação ao preparar a cavidade, realização correta da técnica e uso de um bom sistema adesivo e material restaurador, são desafios para o sucesso do tratamento escolhido.

Uma compreensão melhor do processo e uma tentativa de associar as medidas existentes com tratamentos voltados ao biofilme, tais quais probióticos ou prébióticos, podem ser alternativas para melhorar os tratamentos de cárie radicular. É importante lembrar que, diferentemente da superfície coronária, a superfície radicular possui uma progressão mais rápida das lesões cariosas, caso não haja uma mudança de hábito e não seja realizado nenhum tipo de tratamento. Esse fato é influenciado, principalmente, pelas diferenças em composição entre coroa e raiz, em que a vulnerabilidade radicular ao desafio cariogênico é maior diante da maior proporção de conteúdo orgânico, como o colágeno, em sua composição. Para tratar efetivamente lesões de cárie radicular, o entendimento das características básicas dos tecidos é indispensável no sucesso do tratamento (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2017).

### 1.2.2 Composição dos tecidos dentários duros e cárie radicular

O esmalte dentário compreende o tecido mais mineralizado do corpo, diante de sua quase total composição de conteúdo inorgânico, constituída por 89% de hidroxiapatita de cálcio ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e pequenas quantidades de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$  - 4%), fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$  - 2%) e fosfato de magnésio ( $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  - 1,5%). A hidroxiapatita pura é composta por 57% de fósforo, 40% de cálcio e 2% de íons hidroxila, principalmente por Cálcio (Ca), fosfato (P04), carbonato (CO3), sódio (Na) e magnésio (Mg) (Gedalia, Azaz et al. 1969). Dentre esses minerais, o magnésio tem destaque por exercer influência em muitas características dentárias (Klimuszko, Orywal et al. 2018).

Os íons de Mg levam à inibição do crescimento de cristais, substituindo os íons de cálcio na hidroxiapatita e contribuindo de forma significativa na regulação do crescimento desses cristais. Determinam assim, a estabilidade física e química como resultado da perda maciça de moléculas de inibidores orgânicos entre os estágios de secreção e maturação do esmalte (Teruel Jde, Alcolea et al. 2015, Klimuszko, Orywal et al. 2018). Nos tecidos radiculares, a quantidade superior de magnésio parece conferir mais solubilidade para cristais de hidroxiapatita (Hoppenbrouwers, Driessens et al. 1986).

Na raiz, o cemento é constituído por 45 a 50% de conteúdo inorgânico e 50% de conteúdo orgânico, basicamente colágeno tipo I, como foi sugerido pela primeira vez por Christner em um estudo sobre a caracterização do colágeno humano em cemento (Christner, Robinson et al. 1977). O colágeno da matriz orgânica cementária forma fibrilas cruzadas e induz a mineralização biológica, além de manter a integridade estrutural do cemento após a mineralização (Christner, Robinson et al. 1977). As principais proteínas não colágenas do cemento são as sialoproteínas ósseas e as osteopontinas (Christner, Robinson et al. 1977, Bosshardt and Selvig 1997, Breschi, Maravic et al. 2018).

Semelhante ao cemento, a dentina possui mais material orgânico que o esmalte, aproximadamente 18%. O restante é composto por 70% de materiais inorgânicos, e 12% de água (Goldberg, Kulkarni et al. 2011, Damé-Teixeira, Parolo et al. 2017). É constituída principalmente de cristais de hidroxiapatita dentro de uma matriz orgânica rica de componentes estruturais colágenos, em



que uma variedade de moléculas bioativas são recrutadas (Okamoto, Takahashi et al. 2018).

O nome "colágeno" representa uma família de proteínas da matriz extracelular divididas em 28 tipos diferentes em tamanho, função e distribuição nos tecidos, mas que em todos os casos formam uma estrutura supramolecular com uma tripla hélice característica de três cadeias polipeptídicas alfa na matriz extracelular (Gelse, Pöschl et al. 2003, Ricard-Blum 2011). São caracterizados e divididos de acordo com a complexidade em sua estrutura, suas variantes de emenda, a presença de domínios não helicoidais, sua montagem e sua função. Podem ser homotrímeros, quando formados por três cadeias idênticas, ou heterotrímeros, quando formados por duas ou mais cadeias diferentes (Gelse, Pöschl et al. 2003). Em ambos os casos as três cadeias encontram-se superenroladas em torno de um eixo central (Figura 1). Cada uma destas dentro da molécula forma uma hélice estendida e separada por grupos de 18 aminoácidos (Hulmes and Miller 1979, Gelse, Pöschl et al. 2003).

Um pré-requisito estrutural para a montagem em uma tripla hélice é um resíduo de glicina (sempre posicionado ao centro), o menor aminoácido, em cada terceira posição das cadeias polipeptídicas, resultando em uma estrutura de repetição Gly-X-Y que caracteriza e identifica os domínios "colágenos" (Figura 1). As posições X e Y são frequentemente ocupadas por prolina e hidroxiprolina (Ricard-Blum and Ruggiero 2005). O colágeno tipo I, encontrado nas superfícies radiculares, é caracterizado por sua capacidade de se reunir em agregados supramoleculares orientados com uma estrutura característica heterotrimeca, que contribui para a estabilização molecular e propriedades mecânicas da dentina. Suas fibrilas representam um pilar estrutural, e estão perpendicularmente conectadas por proteínas não colágenas (Hulmes and Miller 1979, Varma, Orgel et al. 2016).

A estrutura molecular é bastante complexa, formada por uma tripla hélice (em torno de 300 nm) composta por três cadeias polipeptídicas paralelas enroladas umas nas outras que se reúnem para formar fibrilas. Esse arranjo é tal que os terminais N de duas hélices triplas adjacentes axialmente são separados por  $D = 67$  nm e os terminais N de duas hélices triplas adjacentes ao lado são separados axialmente por 0,54 nm (Hulmes and Miller 1979). Esse arranjo escalonado cria regiões alternadas de baixa e alta densidade de

proteínas ao longo do eixo da fibrila com uma unidade repetitiva de comprimento D (67nm) (Figura 2) (Hulmes and Miller 1979, Varma, Orgel et al. 2016).

Como descrito por Nyvad e Takahashi, apenas um grupo específico de proteases, as collagenases, seria capaz de degradar o colágeno dentinário nativo. A tripla hélice é cortada em sua estrutura interna através da digestão do grupo amino em uma ligação “Gly-Leu”, na fase aquosa, antes da degradação proteolítica. Isso pode causar flexibilidade intramolecular e permitir clivagem proteolítica específica (Gelse, Pöschl et al. 2003, Takahashi and Nyvad 2016).

Na presença de recessão gengival, seja por doença periodontal associada ao controle inadequado do biofilme local, ou por escovação traumática, um novo nicho ecológico é formado na superfície radicular. Esta superfície, que costumava ser um microambiente anaeróbico recoberto pelo tecido gengival, torna-se um microambiente aeróbico com disponibilidade variável de nutrientes (Gross, Beall et al. 2012). A região radicular exposta constitui então, um local favorável para infiltração microbiana, a partir da conversão do sistema de fibras de colágeno em canais pelos quais as bactérias podem penetrar (Takahashi and Nyvad 2016). Além disso, a escovação realizada de forma inadequada dos dentes ou o próprio tratamento periodontal podem frequentemente danificar ou remover cemento, expondo a dentina ao meio bucal rapidamente (Nascimento, Zaura et al. 2017). Com a acidificação da microbiota bucal resultante do processo cariioso, inicia-se a desmineralização das superfícies dentárias e, conseqüentemente, a formação de lesões cariosas (Takahashi and Nyvad 2016).

### **1.2.3 Formação das lesões cariosas radiculares: fases de desmineralização e degradação da matriz colagenolítica**

O primeiro conceito ecológico de cárie foi proposto por Marsh como "hipótese da placa ecológica", em 1994, e posteriormente estendida por Takahashi e Nyvad (Marsh 1994, Takahashi and Nyvad 2016). Essa hipótese enfatizou que o aumento de algumas espécies de microrganismos na microbiota oral, antes consideradas odontopatógenas, era em resposta a uma mudança nas condições ambientais ocasionadas pelo alto consumo de

carboidratos fermentáveis (Takahashi and Nyvad 2011, Takahashi and Nyvad 2016). Segundo Marsh, o desenvolvimento e progressão de doenças bucais ocorrem devido ao rompimento da homeostase do biofilme no local da lesão, e apesar dessa hipótese ecológica formar a base da atual compreensão da cárie, pouco se discutiu sobre a cárie em superfícies radiculares, enfatizando principalmente, os processos que acometem a região de esmalte (Marsh 1994).

Independente das diferenças de substrato em coroa e raiz dentária, a doença cárie se desenvolve em ambas as superfícies a partir de um desequilíbrio da microbiota, influenciado pela presença de carboidratos fermentáveis disponíveis pela dieta do indivíduo. Esse processo poderá ter como resultado danos permanentes, seja para esmalte ou dentina. Isso significa que, tanto para cárie coronária quanto para cárie radicular, o início do processo em termos bioquímicos necessita dos mesmos fatores, mesmo que a formação das lesões ocorra em velocidade e processos distintos. Em ambas as superfícies existem acidificação do meio e a formação de um biofilme espesso e cariogênico (Fejerskov 2004). No entanto, devido à quantidade considerável de material orgânico nas superfícies radiculares, não só a acidificação bacteriana acontece no desenvolvimento da lesão, mas também a degradação de material orgânico, principalmente colágeno, por meio da ação de proteases (Takahashi and Nyvad 2016).

Estudos ultra-estruturais sugeriram que a desmineralização e degradação da matriz orgânica acontecem em duas etapas sucessivas (Nyvad and Fejerskov 1990). Nos estágios iniciais da cárie em cemento e dentina, os minerais seriam dissolvidos por um gradiente de pH da superfície externa, mantendo a característica de bandas cruzadas das fibras de colágeno (Nyvad and Fejerskov 1990, Deyhle, Bunk et al. 2011). O colágeno desmineralizado serve, então, como um suporte para as bactérias colonizadoras. Em estágios mais avançados, o colágeno exposto é degradado por enzimas proteolíticas, e as fibras de colágeno perdem suas características estruturais (Takahashi and Nyvad 2016).

Um estudo recente, no entanto, sugere que bandas cruzadas de colágeno podem ser degradadas em um período de desmineralização (Tjaderhane, Buzalaf et al. 2015), em que uma região exposta da molécula de

colágeno é degradada pela atividade de proteases colagenolíticas derivadas do hospedeiro, que serão descritas a seguir.

#### 1.2.3.1 Ação de proteases na degradação da matriz colagenolítica

Além dos estudos de Takahash e Nyvad, a hipótese tecido-dependente de Simon-Sóro também explicava que eventos distintos aconteciam para cada tecido. Segundo Simon-Sóro, a doença cárie pode ser dividida em dois estágios, sendo o primeiro em lesões de esmalte e o segundo em lesões de dentina. Nesses dois estágios, genes envolvidos na tolerância ao estresse ácido e na fermentação dietética do açúcar estariam relacionados ao estágio inicial de desmineralização (lesões em esmalte), enquanto outros genes que codificam a tolerância ao estresse osmótico, bem como colagenases e outras proteases, estariam relacionados à degradação da matriz dentinária (Simon-Soro, Belda-Ferre et al. 2013, Simon-Soro, Guillen-Navarro et al. 2014).

Essas proteases, entretanto, não podem atingir substratos proteicos ou serem ativadas em tecidos mineralizados. Desse modo, as moléculas de colágeno intactas são resistentes a várias proteases, com exceção das colagenases, e, portanto, sua estrutura interna deve ser solubilizada e desnaturada na fase aquosa antes da degradação proteolítica (Takahashi and Nyvad 2016). Há maior evidência de que esse papel seja realizado por metaloproteinasas do hospedeiro, capazes de digerir proteínas da matriz extracelular e que apresentam funções importantes em diversos processos biológicos, descritos a seguir.

#### 1.2.3.2 Metaloproteinasas nos tecidos do hospedeiro

Em 1962, Gross e Lapière deram início aos estudos sobre metaloproteinasas ao encontrarem uma enzima ativa na cultura de fragmentos da pele de ratos, a qual degradou a tripla hélice do colágeno tipo I maduro. A fim de compreender melhor o papel dessas enzimas nos diferentes processos patológicos ou não, muitos estudos passaram a se dedicar à pesquisa de metaloproteinasas no microambiente bucal (Gross and Lapiere 1962). Essas metaloproteinasas da matriz (MMPs) são um importante grupo de enzimas

responsáveis pela degradação da matriz extracelular e membranas basais, fortemente relacionadas a processos fisiológicos e patológicos bucais. Estão presentes, por exemplo, na destruição tecidual periodontal, nas lesões de cárie radicular, nas metástases em alguns tipos de tumores e nas desordens da articulação temporomandibular (Birkedal-Hansen 1993). Em superfícies radiculares, por exemplo, um estudo *in situ* realizado por Van Strip e colaboradores avaliou e identificou a presença de metaloproteinases (MMP-2) na saliva e em amostras de dentina completamente desmineralizadas. Fato este que sugere um potencial papel na degradação da matriz extracelular durante o processo carioso (van Strijp, Jansen et al. 2003).

Segundo Birkedal-Hansen, a atividade das MMPs em substratos da matriz extracelular é regulada por quatro vias: 1) por regulação transcricional dos genes das MMPs; 2) por ativação de precursores; 3) por diferenças na especificidade de substratos; e 4) por inibidores de MMPs. A liberação e produção dessas metaloproteinases acontece por meio de células como os queratinócitos, os leucócitos polimorfonucleares, os macrófagos, os monócitos, os fibroblastos e as células mesenquimais, que na presença de fatores de crescimento e citocinas (Interleucina 1, a TNF- $\alpha$  e a TGF- $\alpha$ ) liberam as MMPs para o meio extracelular (Birkedal-Hansen 1993).

Quanto à classificação, mais de 30 tipos diferentes de MMPs humanas foram identificadas e divididas em cinco grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna (Figura 3): matrilisinas, colagenases, gelatinases, estromelinas e metaloestases; e MT – MMP (1, 2, 3 e 4). Todas as MMPs tem um domínio catalítico de ligação de zinco e cálcio de cerca de 165 resíduos que permite a hidrólise do substrato, bem como clivagens autolíticas. São secretadas primeiramente na forma de zimogenes, ou seja, proenzimas inativas, que serão ativadas por uma segmentação de uma parte denominada propeptídeo (Birkedal-Hansen 1993, Bartlett, Simmer et al. 1996, Murphy and Knauper 1997).

Um dos meios de controlar a atividade das MMPs é a presença dos inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As TIMPs constituem proteínas pequenas e multifuncionais amplamente visadas pela comunidade científica, já que são capazes de regular o nível de ativação das MMPs e sua habilidade de hidrolisar um determinado substrato.

Significa dizer que, criar um inibidor sintético de metaloproteinases seria um grande avanço no controle de várias patologias que envolvem essas enzimas (Visse and Nagase 2003).

### 1.2.3.3 Colagenases e cárie radicular

As MMPs são normalmente relacionadas com a remoção de proteínas da matriz dentinária, cementária e de esmalte durante a sua maturação, resultando, para este último, um tecido altamente mineralizado. No entanto, durante o estabelecimento da doença cárie, também é provável a ação de proteases, presentes em quantidade considerável na estrutura do cemento ou dentina (Kawasaki and Featherstone 1997).

Dentre essas proteases, o papel das colagenases na doença tem sido discutido em alguns estudos que associam essas proteases a degradação da matriz de colágeno durante a progressão da cárie dentinária, como uma resposta dos tecidos do hospedeiro ao desafio cariogênico em condições ácidas. Em resumo, durante o desenvolvimento de lesões cariosas, a matriz orgânica dentinária sofre degradação por ação de enzimas derivadas do hospedeiro, e por outras proteases como as MMPs presentes na dentina. MMPs derivadas da saliva também podem estar envolvidas nesse processo, uma vez que a saliva tem contato direto à dentina afetada (Chaussain-Miller, Fioretti et al. 2006). Como mostrou Tjaderhane e colaboradores, uma vez que as moléculas de colágeno são expostas, a atividade telopeptídica das colagenases derivadas do hospedeiro (presentes inclusive na saliva) começa a quebrar parcialmente a região telopeptídica das moléculas, e dessa forma, podem degradar ainda mais as moléculas e transformá-las em componentes mais solúveis em água (Tjaderhane, Buzalaf et al. 2015).

Outras proteases como metaloproteinases de matriz (MMP-2, 3, 8, 9 e 20) e cisteína catepsinas (B e K) estão presentes na matriz orgânica dentinária e são ativadas automaticamente sob condições ácidas (em torno de pH 4,5) no momento em que a dentina é desmineralizada ou exposta à fase aquosa, dando início a degradação da superfície (Sulkala, Larmas et al. 2002, Mazzoni, Pashley et al. 2009, Shimada, Ichinose et al. 2009, Toledano, Nieto-Aguilar et al. 2010, Boushell, Kaku et al. 2011, Buzalaf, Charone et al. 2015, Tjaderhane,

Buzalaf et al. 2015, Takahashi and Nyvad 2016). Os componentes dentinários, dentre eles fosfolipídeos e glicoproteínas, representam substratos potenciais para a degradação por proteinases, como as MMPs. Além disso, a localização de várias MMPs na dentina sugere que essas enzimas podem participar do processo de degradação associado ao desenvolvimento de cárie (Chaussain-Miller, Fioretti et al. 2006).

O papel das collagenases do hospedeiro foi bem descrito, entretanto, não é sabido ainda o verdadeiro papel bacteriano neste processo de degradação da parte orgânica da dentina, em particular a radicular. Muitas bactérias, como *Prevotella sp* e espécies de *Propionibacterium sp*, que já foram isoladas de lesões radiculares, possuem suas próprias collagenases, fato que poderia sugerir o envolvimento desses microrganismos nesta fase (Aas, Griffen et al. 2008, Preza, Olsen et al. 2009, Takahashi and Nyvad 2016). Estudos mostraram que o *S. mutans*, um microrganismo fortemente relacionado a fase I (desmineralização), não estaria associado à degradação da matriz colágena em lesões dentinárias (Argimón and Caufield 2011). No entanto, Damé-Teixeira e colaboradores mostraram superexpressão de genes em *S. mutans* (SMU\_761 e SMU\_759 - *S. mutans* UA159) relacionados a atividade proteolítica e collagenases em lesões de cárie radicular (Figura 4, Quadro 1) (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018). Outros microrganismos também apresentaram genes relacionados à collagenases, demonstrando potencial envolvimento com degradação proteica. São eles: *Veillonella parvula* DSM 2008 (VPAR\_RS05935 e VPAR\_RS05390), *Veillonella dispar* ATCC 17748 (VEIDISOL\_RS04770) e *Leptotrichia buccalis* (LEBU\_RS05040).

Ambos os genes encontrados codificam a protease tipo collagenase, família PrtC, que são peptidases U32 (Ajdić, McShan et al. 2002). O SMU\_761 codifica uma proteína de 428 aa, enquanto o SMU\_759 codifica uma proteína de 308 aa. A família U32 de peptidases é uma ampla família de enzimas com uma estrutura pouco conhecida e mecanismo catalítico. A presença dessa família foi descrita também em outras bactérias patogênicas como a *Porphyromonas gingivalis*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* e *Aeromonas veronii* (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018).

Em todos os casos são collagenases putativas, geralmente relacionadas com infecções bacterianas (Navais, Méndez et al. 2014, Damé-Teixeira, Parolo

et al. 2018). Em *Porphyromonas gingivalis*, por exemplo, estudos relataram o potencial papel de colagenases U32 na virulência bacteriana. É um microrganismo capaz de degradar colágeno fibrilar tipo I solúvel e reconstituído à temperatura corporal ou abaixo (Zhang, Ran et al. 2015, Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018). Essas análises foram possíveis a partir da caracterização de uma protease purificada expressa a partir do gene prtC da bactéria (Kato, Takahashi et al. 1992).

Quadro 1 - Sequências de proteínas e gene alvo (Fonte: ncbi)

Gene	Protein	Protein sequence FASTA	Gene sequence FASTA
SMU_759	NP_721176.1	MEKIVITATAESIEQVKELLTSGVDRIYVGEKD YALRLPHAFSYDDLKIASLVHEAGKELTVAA NALMH QEMMDNIKPFLELMKEIQVDYLVVGDAGVFY VNKRDRGYHFKLIYDTSVFVTSSRQVNFVWGQ HGAVEAVLA REIPSEELFEMSKNLEIPAEVLVYGASVIHHSK RPLIQNYNFTHIDDEKTRERGLFLSEPNDPK SHYSI YEDKHGTHIFINNDIDLMTKLPELINHHYNHW KLDGIYCPGHNFVEIVQLFVKARDMIEAGTFT QDQAFL FDEQIRKLHPAGRGLDTGFYELDPQTVK	ATGGAAAAAATTGTTATCACTGCGACTGCAG AATCTATTGAACAAGTTAAAGAATTACTGACA AGTGGTG TTGACCGTATTTATGTTGGTGAGAAAGATTAT GCGCTTCGTTTACCGCATGCGTTTAGCTATG ATGACTT AAGAAAAATTGCTAGCTTGGTTCATGAAGCT GGTAAAGAATTAACGGTTGCTGCTAATGCAC TAATGCAT CAAGAAATGATGGACAATATTAACCATTTTT AGAATTAATGAAGGAAATTCAGGTAGATTAC TTAGTGG TTGGTGATGCAGGTGTTTTTTATGTCAATAAG CGTGATGGTTATCATTTTAAACTCATTTATGA TACCTC TGTTTTTGTACCTCTAGTCGTCAAGTTAATT TTTGGGGCCAACACGGTGCGGTAGAAGCTG TTTTGGCA CGTGAAATTCCTTCGGAAGAACTGTTTGAAA TGTCCAAAAATCTGGAAATTCCTGCAGAAGT CTTAGTTT ACGGTGCTTCTGTCATTCATCATTCCAAGCG ACCTTTAATACAGAATTATTATAATTTTACTCA CATTGA TGATGAGAAGACAAGAGAACGCGGTCTGTT CTTATCAGAACCAAATGATCCTAAATCGCAC TATTCTATA TATGAAGATAAACACGGCACTCATATTTTTAT CAATAATGATATTGATTTGATGACCAAATTGC CTGAAT



			<p>TGATTAATCATCATTACAATCATTGGAAATTA  GATGGTATCTATTGTCCAGGACATAATTTTGT  TGAGAT  TGTTCAACTTTTTGTTAAAGCAAGAGATATGA  TCGAAGCTGGGACTTTTACGCAAGATCAGGC  TTTTCTT  TTCGATGAACAAATTAGAAAGCTTCATCCAG  CTGGTCGTGGTTTAGATACAGGATTTTATGA  GCTTGATC CGCAAACAGTTAAGTAA</p>
SMU_761	NP_721177.1	<p>MTKQLKRPEVLSPAGTLEKLKVAVNYGADAV  FVGGQAYGLRSRAGNFSMEEMAEGINYAH  DHGVKVVYVAA  NMVTHEGNEIGAGAWFRELRLGLDAVIVS  DPALIAICATDAPGLEIHLSTQASSTNYETFE  FWKELGLT  RVVLAREVTMAELAEIRKRTSVEIEAFVHGA  MCISYSGRCVLSNHMSHRDANRGGCSQSC  RWKYNLYDMP  FGQERRSLKGEVPEEFSMSAVDMCMIENIP  DMIENGVDLKIIEGRMKSIIHYVSTVTNCYKA  AVNAYLESP  QAFEAIKQDLIDELWKVAQRELATGFYYQTP  TENEQLFGARRKIPQYKFVGEVDFDEPSM  TATIRQRNV  INEGDRVEFYGPGFRHFETFITDLHDADGQK  IERAPKPMELLTITVPQEVKAGDMIRACKEGL  VNLYKED GSSLTVRT</p>	<p>ATGACAAAACAATTAACGCCAGAAAGTGC  TATCGCCTGCTGGGACTTTAGAAAAATTA  AGTTGCTG  TTAACTATGGAGCAGATGCTGTTTTTGTGG  CGGACAAGCTTATGGTTTGCAGTCGTGC  AGGTAAGT  TTCGATGGAAGAAATGGCTGAAGGAATTAAT  TATGCTCATGATCATGGGGTCAAGGTTTATG  TGGCTGCT  AACATGGTAACTCATGAGGGCAATGAAATAG  GAGCCGGTGCATGGTTTCGTGAATTACGCG  ACTTAGGTC  TAGATGCAGTTATTGTATCGGATCCAGCCCT  TATTGCGATTTGTGCGACAGATGCACCTGGT  TTGAAAT  TCATTTGTCAACTCAAGCTTCATCCACTAACT  ATGAAACCTTTGAATTTTGGAAAGAACTGGG  CTTGACA  CGTGTTGTTTTAGCGCGTGAAGTCACAATGG  CAGAACTAGCTGAGATTCGTAAGCGTACGA  GTGTTGAAA  TTGAAGCCTTTGTTTATGGGGCAATGTGTAT  TTCTTATTCAGGACGCTGTGTACTTTCCAATC  ATATGAG  TCATCGCGATGCTAATCGTGGTGGTTGTTCA  CAATCTTGTCGTTGGAAATACAATCTTTATGA  TATGCCT</p>

		<p>TTCGGTCAAGAAAGACGGTCATTGAAAGGTG AAGTACCAGAGGAATTTCAATGTCAGCTGT TGATATGT</p> <p>GCATGATTGAAAATATTCCAGACATGATTGA AAATGGTGTGATAGCCTTAAAATTGAAGGA CGTATGAA</p> <p>GTCTATTCACTATGTTTCGACGGTCACAAATT GTTACAAGGCGGCTGTCAATGCCTATCTGGA AAGCCCT</p> <p>CAAGCATTGAAGCTATCAAACAAGATTTGA TTGACGAATTGTGAAAGTCGCTCAGCGTGA ATTGGCTA</p> <p>CAGGTTTCTATTACCAAACACCTACTGAAAAT GAACAGCTTTTTGGAGCTCGTCGTAAAATTC CCAATA</p> <p>TAAATTTGTCGGTGAAGTGGTTGATTTGAT GAGCCAAGTATGACAGCAACTATTCGTCAGC GTAATGTC</p> <p>ATTAATGAGGGGGATCGGGTTGAATTCTACG GACCTGGTTTCCGTCATTTTGAAACCTTTATT ACAGATT</p> <p>TACATGATGCGGATGGTCAAAAATTGAACG TGCGCCAAAACCGATGGAGTTATTGACAATT ACGGTACC</p> <p>ACAGGAAGTCAAAGCAGGTGATATGATTCGT GCCTGCAAGGAAGGCTTGGTCAATCTTTACA AAGAAGAT</p> <p>GGCAGCAGCCTTACTGTTAGA ACTTAA</p>
--	--	--

#### 1.2.4 Papel das bactérias, especialmente o *Streptococcus mutans* e formação do biofilme dentário radicular

Em algumas doenças, um papel muito importante desempenhado pelas bactérias está na capacidade de formar um conjunto multidimensional conhecido como biofilme, que consiste em comunidades altamente complexas firmemente aderidas sobre os dentes ou outras estruturas bucais sólidas (Aas, Griffen et al. 2008, Krzysciak, Jurczak et al. 2014). Os principais componentes do biofilme formado na superfície dos dentes incluem: glucano, frutano, e proteínas, além disso, diferem da saliva circundante em termos de níveis de lipídios, cálcio, magnésio, flúor e fósforo. *In situ*, 80% consiste em água (Bowen and Koo 2011). Portanto, existe a formação de uma membrana amorfa com condições ideais para a sobrevivência bacteriana que irá determinar a virulência da estrutura do biofilme.

Em um ambiente favorecido por uma dieta rica em sacarose associada à presença de biofilme nas superfícies dentárias, e consequente diminuição do pH local, bactérias com grande potencial cariogênico atuam de modo a degradar os tecidos do hospedeiro. Isso ocorre devido à produção de ácido resultante do metabolismo de açúcares e a subsequente desmineralização da superfície dentária (Takahashi and Nyvad 2008, Marsh 2010). Na superfície radicular, o biofilme é composto não só por uma variedade de organismos sacarolíticos, acidúricos e acidogênicos, mas por bactérias proteolíticas, que podem produzir ácidos ou amônia a partir do catabolismo de substratos nitrogenados, disponíveis exogenamente ou da matriz orgânica da dentina (Dame-Teixeira, Parolo et al. 2016).

A microbiota presente nesse biofilme cariogênico radicular é muito mais complexa em comparação com a microbiota do esmalte, fato que pode ser explicado pelas diferenças nas condições microambientais de cada superfície (Syed, Loesche et al. 1975, Do, Damé-Teixeira et al. 2017). Para cárie radicular, apesar de estudos afirmarem que o *S. mutans* constitua apenas uma pequena proporção da microbiota (Bowden 1990), esse microrganismo demonstra uma forte relação com a doença, presente em maiores frequências em superfícies radiculares cariadas do que em biofilmes de superfícies radiculares híginas (Ellen, Banting et al. 1985, Nyvad and Kilian 1990) e

desempenhando papel fundamental na progressão da cárie radicular (Ellen, Banting et al. 1985, Do, Damé-Teixeira et al. 2017).

Apesar de ser o habitat específico de *S. mutans*, estudos mostram claramente que a microbiota bucal passa por mudanças durante as alterações da superfície dentária com o desenvolvimento de lesões de cárie, desde a dominância inicial de estreptococos não-mutans e *Actinomyces* para a dominância de *Streptococcus* e outras bactérias, incluindo *Lactobacilos* e *Bifidobacterium* nos estágios posteriores da cárie dentária (Takahashi and Nyvad 2011, Simon-Soro, Belda-Ferre et al. 2013). Na fase inicial, por serem capazes de produzir ácidos a partir de sacarose alimentar e, conseqüentemente, iniciar a desmineralização da superfície dentária, altas proporções de *S. mutans* e ou outras bactérias acidúricas podem ser considerados biomarcadores para cárie. Nos tecidos radiculares, além de *S. mutans*, *Lactobacillus spp.* e *Actinomyces*, outras espécies como *Atopobium*, *Olsenella*, *Pseudoramibacter*, *Propionibacterium*, *Selemonas*, também foram observadas (Becker, Paster et al. 2002, Preza, Olsen et al. 2008, Takahashi and Nyvad 2008).

Nessa pesquisa, a bactéria em evidência é o *S. mutans*, que já foi identificado como indutor de cárie com várias funções essenciais para cariogenicidade (Takahashi and Nyvad 2011). No entanto, a presença deste microrganismo na saliva ou biofilme por si só não explica o desenvolvimento de cárie (Aas, Griffen et al. 2008). É necessário considerar o caráter complexo da doença, como uma disbiose, influenciada por condições comportamentais, sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população, com destaque para a dieta com alto teor de sacarose, a qualidade e a frequência de higiene bucal como fundamentais para a ocorrência da doença cárie.

### **1.2.5 Características da bactéria *Streptococcus mutans* e manipulação do seu genoma**

O *S. mutans* é um microrganismo pertencente ao filo Firmicutes, em formato de coco, Gram-positivo, anaeróbio facultativo e catalase-negativo, encontrado na cavidade bucal humana (Hamada and Slade 1980). Foi isolado pela primeira vez em 1924, por J. Clarke (Clarke 1924), dando início à

caracterização da bactéria. Mas somente no final de 1950 ganhou ampla atenção da comunidade científica e, em meados da década de 1960, estudos clínicos e laboratoriais baseados em animais descreveram *S. mutans* como o agente etiológico na cárie dentária (Fitzgerald and Keyes 1960, Loesche 1986, Lemos, Palmer et al. 2019).

Com a publicação da sequência completa do genoma da cepa de *S. mutans* UA159 foi possível entender melhor sobre sua adaptação pra sobreviver no ambiente oral, defesa contra fatores do hospedeiro e uso de produtos genéticos que mantêm seu nicho contra concorrentes microbianos (Ajdic, McShan et al. 2002). Foram detectados 2.030.936 pares de bases e 1.963 ORFs (Open Reading Frames) dos quais 63% possuem funções putativas (Ajdic, McShan et al. 2002). As cepas encontradas podem ser classificadas em quatro grupos sorológicos (*c*, *e*, *f* e *k*) com base na composição do polissacarídeo ramnose-glicose na superfície celular, com cerca de 75% das estirpes isoladas de biofilmes dentários pertencentes ao sorotipo *c*, ~20% ao sorotipo *e*, e 5% classificados como sorotipos *f* ou *k* (Nakano and Ooshima 2009).

É um microrganismo que reside principalmente em biofilmes formados sobre a superfície dentária, relacionado com a doença cárie e responsável por casos de endocardite infecciosa com um subconjunto de cepas sendo indiretamente ligadas ao início de patologias extra-orais adicionais (Nakano and Ooshima 2009). Sua patogênese está relacionada a diversos mecanismos de sobrevivência, dando-lhes vantagens competitivas sobre outras espécies, com destaque para: a capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir de sacarose, a capacidade de transportar e metabolizar uma ampla gama de carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade); e a capacidade de prosperar sob condições de estresse ambiental, especialmente em baixo pH (aciduricidade) (Ajdic, McShan et al. 2002, Lemos, Palmer et al. 2019). Desse modo, é capaz de formar um meio ácido e rico em polissacarídeos, propiciando um ambiente favorável para o desenvolvimento de outras espécies acidogênicas e acidúricas (Lemos, Palmer et al. 2019).

Diferentes metodologias são aplicadas no estudo biomolecular dessa bactéria, com o objetivo de entender esse papel em lesões cariosas. Técnicas

de engenharia genética, por exemplo, estudam as possibilidades de obter *S. mutans* mutantes para avaliar as consequências dessas modificações (Li, Lau et al. 2001, Ahn, Wen et al. 2006, Morrison, Khan et al. 2015). No entanto, além das inúmeras variações de protocolos e a falta de uma técnica padrão para manipulação genética de *S. mutans*, as condições de crescimento que levam ao desenvolvimento espontâneo de competências não estão bem definidas, mas variações sutis podem ter efeitos profundos na capacidade de desenvolver competência (Shah and Caufield 1993). Isso significa que mesmo com a aplicação de diferentes técnicas de transformação, não é garantida a obtenção final de clones/mutantes verdadeiros.

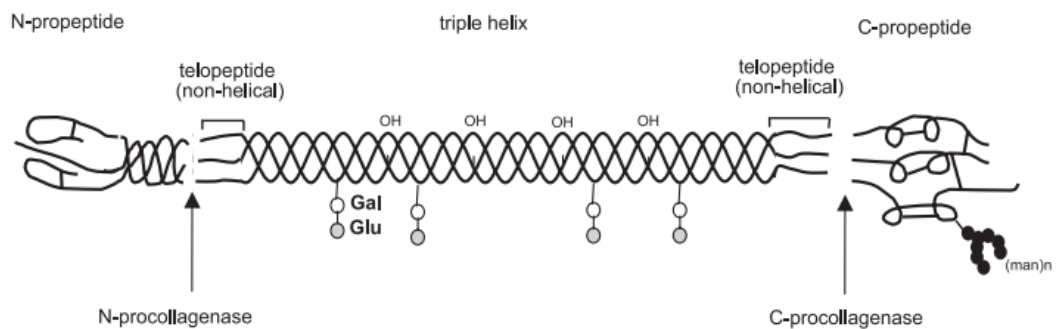
### 1.2.6 Princípios básicos da clonagem molecular e do DNA recombinante

A clonagem molecular é uma das opções mais aplicadas para manipulação genética bacteriana. Consiste em uma técnica que permite remover um “pedaço” do DNA e combiná-lo com outro, produzindo muitas cópias de diferentes combinações genéticas (Soares 1997). A partir da clonagem é possível fazer genes heterólogos serem expressos em bactérias e leveduras ou mesmo em outras células. É a técnica central da metodologia DNA recombinante a partir do isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas (Lessard 2013). Compreende geralmente duas importantes etapas: **ligação e transformação.**

**Ligação de um fragmento de DNA de interesse:** Como o próprio nome diz, nessa etapa, um sistema de ligação é criado com a união do produto de PCR (reação em cadeia da polimerase) e um vetor (plasmídeo) previamente selecionado (Remick, Kunkel et al. 1990). Os plasmídeos são moléculas de DNA fita dupla extracromossomal encontrados em todas as espécies de bactérias que possuem três características comuns: marca seletiva, origem de replicação e sítio múltiplo de clonagem (Sambrook 2001). A marca seletiva refere-se a genes que conferem resistência a antibióticos e que proporcionam a seleção dos clones transformados daqueles não transformados.

**Transformação:** Griffith e Avery descreveram por muitos anos a transformação natural como um evento raro, disponível apenas para algumas espécies (Avery, Macleod et al. 1944). No entanto, em 1970 Mandel e Higa

descreveram um método com cloreto de cálcio (transformação por choque térmico) que seria capaz de aumentar a capacidade das células de captarem o DNA do bacteriófago, e identificaram *Escherichia coli* como altamente competente para transformação com DNA exógeno (Mandel and Higa 1970, Gingold 1985) Nesse processo, a molécula do DNA recombinante é inserida em uma célula hospedeira compatível que será chamada de transformante quando adquirir a molécula do DNA recombinante. Alguns outros exemplos de células hospedeiras são as bactérias *Bacillus subtilis* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O transformante produzirá, se o protocolo for bem sucedido, uma colônia contendo milhares de cópias do DNA recombinante. Nesta dissertação, será descrito o processo de isolamento e clonagem dos genes que codificam proteases do tipo colagenases da cepa UA159 de *S. mutans*.



**Figura 1** - Gelse, 2003. Estrutura molecular do colágeno tipo I fibrilar com os vários subdomínios, bem como os locais de clivagem das N- e C-procollagenases.

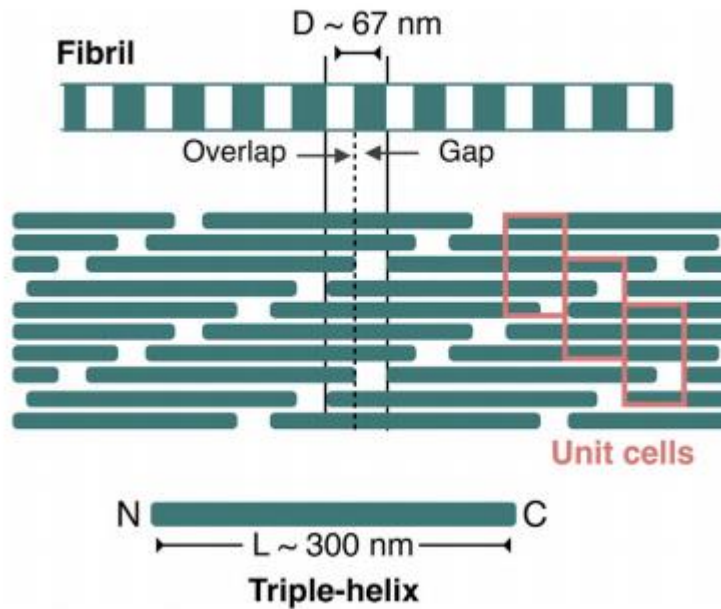


Figura 2 - Varma e colaboradores , 2016. Disposição das fibrilas colágenas.

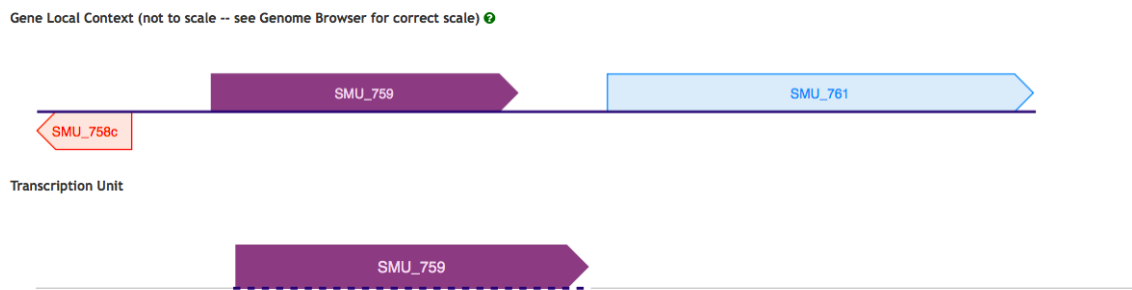
G. Murphy and V. Knäuper

ENZYME	No.	DOMAIN STRUCTURE
<b>Matrilysin</b>	<b>MMP-7</b>	Propeptide (C) — N-terminal domain (catalytic) (Zn) — C-terminal domain (hemopexin-like repeats) (C)
<b>Collagenase -1, -2, -3</b>	<b>MMP-1, -8, -13</b>	Propeptide (C) — N-terminal domain (catalytic) (Zn) — C-terminal domain (hemopexin-like repeats) (C)
<b>Matelloelastase</b>	<b>MMP-12</b>	Propeptide (C) — N-terminal domain (catalytic) (Zn) — Gelatin binding domain (fibronectin-like repeats) (C)
<b>Stromelysin</b>	<b>MMP-3, -10, -11</b>	Propeptide (C) — N-terminal domain (catalytic) (Zn) — Gelatin binding domain (fibronectin-like repeats) (C)
<b>Gelatinase -A, -B</b>	<b>MMP-2, -9</b>	Propeptide (C) — N-terminal domain (catalytic) (Zn) — Gelatin binding domain (fibronectin-like repeats) (C)
<b>MT-MMP</b>	<b>MMP-14, -15, -16, -17</b>	Propeptide (C) — N-terminal domain (catalytic) (Zn) — Gelatin binding domain (fibronectin-like repeats) (C) — Membrane domain

. Domain constitution of the matrix metalloproteinases.

Figura 3 - Murphy, 1997. Classificação das metaloproteinasas.





**Figura 4** - Contexto dos genes de collagenase no genoma do *Streptococcus mutans* UA159.

Fonte: <https://biocyc.org/SMUT210007>.

## 1.3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

### 1.3.1 Objetivo Geral

Manipular geneticamente *Streptococcus mutans* UA159 através da avaliação de duas colagenases, possivelmente envolvidas na segunda fase de formação da lesão cariosa radicular.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- 1) Isolar o gene SMU\_761 do genoma do *S. mutans* UA159;
- 2) Isolar o gene SMU\_759 do genoma do *S. mutans* UA159;
- 3) Clonar a sequência gênica da colagenase (gene SMU\_761) em vetor de expressão pGEM®-T;
- 4) Clonar a sequência gênica da colagenase (gene SMU\_759) em vetor de expressão pGEM®-T;
- 5) Construção de um cassete para inativação do gene SMU\_761 no vetor pSC;
- 6) Construção de um cassete para inativação do gene SMU\_759 no vetor pSC.

### 1.3.3 Justificativa

Diante do possível envolvimento de duas colagenases putativas do *S. mutans* na formação de lesões de cárie radicular, nosso grupo de pesquisa trabalha no desenvolvimento de linhagens de *S. mutans* com inibição dos genes que codificam tais colagenases. É de nosso interesse construir novas ferramentas que possibilitem a manipulação genética de *S. mutans*, a fim de verificar se existe alguma diferença no padrão de desenvolvimento de lesões cariosas radiculares na presença de cepas mutantes. Qualquer alteração no padrão de formação de lesões utilizando esse modelo significa uma importante descoberta no campo odontológico e biomolecular, visto as inúmeras possibilidades de pesquisa com cepas modificadas geneticamente sendo um possível alvo para novas estratégias de tratamento.

## 1.4 REFERÊNCIAS

1. Aas, J. A., A. L. Griffen, S. R. Dardis, A. M. Lee, I. Olsen, F. E. Dewhirst, E. J. Leys and B. J. Paster (2008). "Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults." J Clin Microbiol **46**(4): 1407-1417.
2. Ahn, S. J., Z. T. Wen and R. A. Burne (2006). "Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159." Infect Immun **74**(3): 1631-1642.
3. Aires, C. P., C. P. Tabchoury, A. A. Del Bel Cury and J. A. Cury (2002). "Effect of a lactose-containing sweetener on root dentine demineralization in situ." Caries Res **36**(3): 167-169.
4. Ajdic, D., W. M. McShan, R. E. McLaughlin, G. Savic, J. Chang, M. B. Carson, C. Primeaux, R. Tian, S. Kenton, H. Jia, S. Lin, Y. Qian, S. Li, H. Zhu, F. Najjar, H. Lai, J. White, B. A. Roe and J. J. Ferretti (2002). "Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14434-14439.
5. Argimón, S. and P. W. Caufield (2011). "Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience." J Clin Microbiol **49**(3): 984-992.
6. Avery, O. T., C. M. Macleod and M. McCarty (1944). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *pneumococcus* type iii." J Exp Med **79**(2): 137-158.
7. Baca, P., J. Clavero, A. P. Baca, M. P. Gonzalez-Rodriguez, M. Bravo and M. J. Valderrama (2009). "Effect of chlorhexidine-thymol varnish on root caries in a geriatric population: a randomized double-blind clinical trial." J Dent **37**(9): 679-685.
8. Bartlett, J. D., J. P. Simmer, J. Xue, H. C. Margolis and E. C. Moreno (1996). "Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ." Gene **183**(1-2): 123-128.
9. Becker, M. R., B. J. Paster, E. J. Leys, M. L. Moeschberger, S. G. Kenyon, J. L. Galvin, S. K. Boches, F. E. Dewhirst and A. L. Griffen (2002). "Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries." J Clin Microbiol **40**(3): 1001-1009.
10. Birkedal-Hansen, H. (1993). "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases." J Periodontol **64**(5 Suppl): 474-484.

11. Bosshardt, D. D. and K. A. Selvig (1997). "Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root." Periodontol 2000 **13**: 41-75.
12. Botelho, J. N., M. Villegas-Salinas, P. Troncoso-Gajardo, R. A. Giacaman and J. A. Cury (2016). "Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm - caries model." Braz Oral Res **30**(1).
13. Bots-VantSpijker, P. C., J. N. Vanobbergen, J. M. Schols, R. M. Schaub, C. P. Bots and C. de Baat (2014). "Barriers of delivering oral health care to older people experienced by dentists: a systematic literature review." Community Dent Oral Epidemiol **42**(2): 113-121.
14. Boushell, L. W., M. Kaku, Y. Mochida and M. Yamauchi (2011). "Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin." Int J Oral Sci **3**(4): 192-199.
15. Bowden, G. H. (1990). "Microbiology of root surface caries in humans." J Dent Res **69**(5): 1205-1210.
16. Bowen, W. H. and H. Koo (2011). "Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms." Caries Res **45**(1): 69-86.
17. Breschi, L., T. Maravic, S. R. Cunha, A. Comba, M. Cadenaro, L. Tjäderhane, D. H. Pashley, F. R. Tay and A. Mazzoni (2018). "Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications." Dent Mater **34**(1): 78-96.
18. Burrow, M. F. and M. A. Stacey (2017). "Management of Cavitated Root Caries Lesions: Minimum Intervention and Alternatives." Monogr Oral Sci **26**: 106-114.
19. Buzalaf, M. A., S. Charone and L. Tjaderhane (2015). "Role of host-derived proteinases in dentine caries and erosion." Caries Res **49 Suppl 1**: 30-37.
20. Chaussain-Miller, C., F. Fioretti, M. Goldberg and S. Menashi (2006). "The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries." J Dent Res **85**:22–32.
21. Christensen, K., G. Doblhammer, R. Rau and J. W. Vaupel (2009). "Ageing populations: the challenges ahead." Lancet **374**(9696): 1196-1208.
22. Christner, P., P. Robinson and C. C. Clark (1977). "A preliminary characterization of human cementum collagen." Calcif Tissue Res **23**(2): 147-150.

23. Chu, C. H., M. L. Mei and E. C. Lo (2010). "Use of fluorides in dental caries management." Gen Dent **58**(1): 37-43; quiz 44-35, 79-80.
24. Cieplik, F., N. S. Jakubovics, W. Buchalla, T. Maisch, E. Hellwig and A. Al-Ahmad (2019). "Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern?" Front Microbiol **10**: 587.
25. Clarke, J. K. (1924). "On the Bacterial Factor in the Etiology of Dental Caries." Br J Exp Pathol **5**(3): 141-147.
26. Cruz Gonzalez, A. C. and D. J. Marín Zuluaga (2016). "Clinical outcome of root caries restorations using ART and rotary techniques in institutionalized elders." Braz Oral Res **30**(1).
27. Damé-Teixeira, N., C. C. F. Parolo and M. Maltz (2017). "Specificities of Caries on Root Surface." Monogr Oral Sci **26**: 15-25.
28. Dame-Teixeira, N., C. C. F. Parolo, M. Maltz, A. Tugnait, D. Devine and T. Do (2016). "*Actinomyces spp.* gene expression in root caries lesions." Journal of oral microbiology **8**: 32383.
29. Damé-Teixeira, N., C. Parolo, M. MALTZ, A. RUP, D. Devine and T. Do (2018). "Gene expression of bacterial collagenolytic proteases in root caries." Journal of Oral Microbiology **10**: 1424475.
30. Deyhle, H., O. Bunk and B. Muller (2011). "Nanostructure of healthy and caries-affected human teeth." Nanomedicine **7**(6): 694-701.
31. Do, T., N. Damé-Teixeira, M. Naginyte and P. D. Marsh (2017). "Root Surface Biofilms and Caries." Monogr Oral Sci **26**: 26-34.
32. Ellen, R. P., D. W. Banting and E. D. Fillery (1985). "*Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk." J Dent Res **64**(10): 1245-1249.
33. Fejerskov, O. (2004). "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care." Caries Res **38**(3): 182-191.
34. Fitzgerald, R. J. and P. H. Keyes (1960). "Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster." J Am Dent Assoc **61**: 9-19.
35. Fure, S. and P. Lingstrom (2009). "Evaluation of different fluoride treatments of initial root carious lesions in vivo." Oral Health Prev Dent **7**(2): 147-154.
36. Gao, Y. B., T. Hu, X. D. Zhou, R. Shao, R. Cheng, G. S. Wang, Y. M. Yang, X. Li, B. Yuan, T. Xu, X. Wang, X. P. Feng, B. J. Tai, Y. Hu, H. C. Lin, B. Wang, Y. Si, C. X. Wang, S. G. Zheng, X. N. Liu, W. S. Rong, W. J. Wang and W. Yin (2018). "How Root Caries Differs between Middle-

- aged People and the Elderly: Findings from the 4th National Oral Health Survey of China." Chin J Dent Res **21**(3): 221-229.
37. Gedalia, I., B. Azaz and M. Schmerling (1969). "Citrate in the surface enamel of unerupted and erupted teeth." J Dent Res **48**(1): 105-108.
  38. Gelse, K., E. Pöschl and T. Aigner (2003). "Collagens--structure, function, and biosynthesis." Adv Drug Deliv Rev **55**(12): 1531-1546.
  39. Gingold, E. B. (1985). "Bacterial transformation." Methods Mol Biol **2**: 237-240.
  40. Goldberg, M., A. B. Kulkarni, M. Young and A. Boskey (2011). "Dentin: structure, composition and mineralization." Front Biosci (Elite Ed) **3**: 711-735.
  41. Gostemeyer, G., C. da Mata, G. McKenna and F. Schwendicke (2019). "Atraumatic vs conventional restorative treatment for root caries lesions in older patients: Meta- and trial sequential analysis." Gerodontology **36**(3): 285-293.
  42. Griffin, S. O., P. M. Griffin, J. L. Swann and N. Zlobin (2004). "Estimating rates of new root caries in older adults." J Dent Res **83**(8): 634-638.
  43. Gross, E. L., C. J. Beall, S. R. Kutsch, N. D. Firestone, E. J. Leys and A. L. Griffen (2012). "Beyond *Streptococcus mutans*: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis." PLoS One **7**(10).
  44. Gross, J. and C. M. Lapiere (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1014-1022.
  45. Hamada, S. and H. D. Slade (1980). "Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*." Microbiol Rev **44**(2): 331-384.
  46. Hariyani, N., D. Setyowati, A. J. Spencer, L. Luzzi and L. G. Do (2018). "Root caries incidence and increment in the population - A systematic review, meta-analysis and meta-regression of longitudinal studies." J Dent **77**: 1-7.
  47. Hayes, M., F. Burke and P. F. Allen (2017). "Incidence, Prevalence and Global Distribution of Root Caries." Monogr Oral Sci **26**: 1-8.
  48. Heasman, P. A., M. Ritchie, A. Asuni, E. Gavillet, J. L. Simonsen and B. Nyvad (2017). "Gingival recession and root caries in the ageing population: a critical evaluation of treatments." J Clin Periodontol **44 Suppl 18**: S178-s193.

49. Hoppenbrouwers, P. M., F. C. Driessens and J. M. Borggreven (1986). "The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization." J Dent Res **65**(7): 955-958.
50. Hulmes, D. J. and A. Miller (1979). "Quasi-hexagonal molecular packing in collagen fibrils." Nature **282**(5741): 878-880.
51. Kandelman, D., P. E. Petersen and H. Ueda (2008). "Oral health, general health, and quality of life in older people." Spec Care Dentist **28**(6): 224-236.
52. Kato, T., N. Takahashi and H. K. Kuramitsu (1992). "Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis* prtC gene, which expresses a novel collagenase activity." J Bacteriol **174**(12): 3889-3895.
53. Kawasaki, K. and J. D. Featherstone (1997). "Effects of collagenase on root demineralization." J Dent Res **76**(1): 588-595.
54. Kidd, E., O. Fejerskov and B. Nyvad (2015). "Infected Dentine Revisited." Dent Update **42**(9): 802-806, 808-809.
55. Kim, J. K., L. A. Baker, H. Seirawan and E. M. Crimmins (2012). "Prevalence of oral health problems in U.S. adults, NHANES 1999-2004: exploring differences by age, education, and race/ethnicity." Spec Care Dentist **32**(6): 234-241.
56. Klimuszko, E., K. Orywal, T. Sierpinska, J. Sidun and M. Golebiewska (2018). "Evaluation of calcium and magnesium contents in tooth enamel without any pathological changes: in vitro preliminary study." Odontology **106**(4): 369-376.
57. Krzysciak, W., A. Jurczak, D. Koscielniak, B. Bystrowska and A. Skalniak (2014). "The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **33**(4): 499-515.
58. Lemos, J. A., S. R. Palmer, L. Zeng, Z. T. Wen, J. K. Kajfasz, I. A. Freires, J. Abranches and L. J. Brady (2019). "The Biology of *Streptococcus mutans*." Microbiol Spectr **7**(1).
59. Li, R., E. C. Lo, B. Y. Liu, M. C. Wong and C. H. Chu (2016). "Randomized clinical trial on arresting dental root caries through silver diammine fluoride applications in community-dwelling elders." J Dent **51**: 15-20.
60. Lingström, P. and D. Birkhed (1994). "Effect of buccal administration of a lactose-containing nitroglycerin tablet (Suscard) on plaque pH." Scand J Dent Res **102**(6): 324-328.
61. Locker, D. and J. L. Leake (1993). "Coronal and root decay experience in older adults in Ontario, Canada." J Public Health Dent **53**(3): 158-164.

62. Loesche, W. J. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." Microbiol Rev **50**(4): 353-380.
63. Lopez, R., P. C. Smith, G. Gostemeyer and F. Schwendicke (2017). "Ageing, dental caries and periodontal diseases." J Clin Periodontol **44 Suppl 18**: S145-s152.
64. Mamai-Homata, E., V. Topitsoglou, C. Oulis, V. Margaritis and A. Polychronopoulou (2012). "Risk indicators of coronal and root caries in Greek middle aged adults and senior citizens." BMC Public Health **12**: 484.
65. Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-162.
66. Manji, F. and O. Fejerskov (1990). "Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride." J Dent Res **69 Spec No**: 733-741; discussion 820-733.
67. Marsh, P. D. (1994). "Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease." Adv Dent Res **8**(2): 263-271.
68. Marsh, P. D. (2010). "Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries." Dent Clin North Am **54**(3): 441-454.
69. Mazzoni, A., D. H. Pashley, F. R. Tay, P. Gobbi, G. Orsini, A. Ruggeri, Jr., M. Carrilho, L. Tjaderhane, R. Di Lenarda and L. Breschi (2009). "Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis." J Biomed Mater Res A **88**(3): 697-703.
70. Meyer-Lueckel, H. and S. Paris (2016). "When and How to Intervene in the Caries Process." Oper Dent **41**(S7): S35-s47.
71. Meyer-Lueckel, H., V. Machiulskiene and R. A. Giacaman (2019). How to Intervene in the Root Caries Process? Systematic Review and Meta-Analyses. Caries Res. Switzerland, (c) 2015 The Author(s) Published by S. Karger AG, Basel.: 1-10.
72. Morrison, D. A., R. Khan, R. Junges, H. A. Åmdal and F. C. Petersen (2015). "Genome editing by natural genetic transformation in *Streptococcus mutans*." J Microbiol Methods **119**: 134-141.
73. Moye, Z. D., L. Zeng and R. A. Burne (2014). "Modification of gene expression and virulence traits in *Streptococcus mutans* in response to carbohydrate availability." Appl Environ Microbiol **80**(3): 972-985.



74. Murphy, G. and V. Knauper (1997). "Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?" Matrix Biol **15**(8-9): 511-518.
75. Nakano, K. and T. Ooshima (2009). "Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity." Future Microbiol **4**(7): 891-902.
76. Nascimento, M. M., E. Zaura, A. Mira, N. Takahashi and J. M. Ten Cate (2017). "Second Era of OMICS in Caries Research: Moving Past the Phase of Disillusionment." J Dent Res **96**(7): 733-740.
77. Navais, R., J. Méndez, D. Pérez-Pascual, D. Cascales and J. A. Guijarro (2014). "The *yrpAB* operon of *Yersinia ruckeri* encoding two putative U32 peptidases is involved in virulence and induced under microaerobic conditions." Virulence **5**(5): 619-624.
78. Nyvad, B. and M. Kilian (1990). "Microflora associated with experimental root surface caries in humans." Infect Immun **58**(6): 1628-1633.
79. Nyvad, B. and O. Fejerskov (1990). "An ultrastructural study of bacterial invasion and tissue breakdown in human experimental root-surface caries." J Dent Res **69**(5): 1118-1125.
80. Nyvad, B., J. M. ten Cate and O. Fejerskov (1997). "Arrest of root surface caries in situ." J Dent Res **76**(12): 1845-1853.
81. Okamoto, M., Y. Takahashi, S. Komichi, P. R. Cooper and M. Hayashi (2018). "Dentinogenic effects of extracted dentin matrix components digested with matrix metalloproteinases." Sci Rep **8**(1): 10690.
82. Paim, J., C. Travassos, C. Almeida, L. Bahia and J. Macinko (2011). "The Brazilian health system: history, advances, and challenges." Lancet **377**(9779): 1778-1797.
83. Peres, M. A., P. R. Barbato, S. C. Reis, C. H. Freitas and J. L. Antunes (2013). "Tooth loss in Brazil: analysis of the 2010 Brazilian Oral Health Survey." Rev Saude Publica **47** Suppl 3: 78-89.
84. Petersen, P. E. and T. Yamamoto (2005). "Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme." Community Dent Oral Epidemiol **33**(2): 81-92.
85. Preza, D., I. Olsen, J. A. Aas, T. Willumsen, B. Grinde and B. J. Paster (2008). "Bacterial profiles of root caries in elderly patients." J Clin Microbiol **46**(6): 2015-2021.
86. Preza, D., I. Olsen, T. Willumsen, S. K. Boches, S. L. Cotton, B. Grinde and B. J. Paster (2009). "Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**(5): 509-517.

87. Remick, D. G., S. L. Kunkel, E. A. Holbrook and C. A. Hanson (1990). "Theory and applications of the polymerase chain reaction." Am J Clin Pathol **93**(4 Suppl 1): S49-54.
88. Ricard-Blum, S. (2011). "The collagen family." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(1): a004978.
89. Ricard-Blum, S. and F. Ruggiero (2005). "The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane." Pathol Biol (Paris) **53**(7): 430-442.
90. Sambrook, J. and D. Russell (2001). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
91. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003: Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. 52 p.
92. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. 118 p.
93. Shah, G. R. and P. W. Caufield (1993). "Enhanced transformation of *Streptococcus mutans* by modifications in culture conditions." Anal Biochem **214**(1): 343-346.
94. Shimada, Y., S. Ichinose, A. Sadr, M. F. Burrow and J. Tagami (2009). "Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine." Aust Dent J **54**(4): 347-354.
95. Simon-Soro, A., M. Guillen-Navarro and A. Mira (2014). "Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions." Journal of Oral Microbiology **6**.
96. Simon-Soro, A., P. Belda-Ferre, R. Cabrera-Rubio, L. D. Alcaraz and A. Mira (2013). "A tissue-dependent hypothesis of dental caries." Caries Res **47**(6): 591-600.
97. Smith, P. W., K. P. Preston and S. M. Higham (2005). "Development of an in situ root caries model. A. In vitro investigations." J Dent **33**(3): 253-267.
98. Soares, M. B. (1997). "Identification and cloning of differentially expressed genes." Curr Opin Biotechnol **8**(5): 542-546.

99. Sugihara, N., Y. Maki, Y. Okawa, M. Hosaka, T. Matsukubo and Y. Takaesu (2010). "Factors associated with root surface caries in elderly." Bull Tokyo Dent Coll **51**(1): 23-30.
100. Sulkala, M., M. Larmas, T. Sorsa, T. Salo and L. Tjaderhane (2002). "The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth." J Dent Res **81**(9): 603-607.
101. Syed, S. A., W. J. Loesche, H. L. Pape, Jr. and E. Grenier (1975). "Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque." Infect Immun **11**(4): 727-731.
102. Takahashi, N. and B. Nyvad (2008). "Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process." Caries Res **42**(6): 409-418.
103. Takahashi, N. and B. Nyvad (2011). "The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives." J Dent Res **90**(3): 294-303.
104. Takahashi, N. and B. Nyvad (2016). "Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries." Caries Res **50**(4): 422-431.
105. Teruel Jde, D., A. Alcolea, A. Hernández and A. J. Ruiz (2015). "Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth." Arch Oral Biol **60**(5): 768-775.
106. Tjaderhane, L., M. A. Buzalaf, M. Carrilho and C. Chaussain (2015). "Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'." Caries Res **49**(3): 193-208.
107. Toledano, M., R. Nieto-Aguilar, R. Osorio, A. Campos, E. Osorio, F. R. Tay and M. Alaminos (2010). "Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine." J Dent **38**(8): 635-640.
108. van Strijp, A. J., D. C. Jansen, J. DeGroot, J. M. ten Cate and V. Everts (2003). "Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ." Caries Res **37**(1): 58-65.
109. Varma, S., J. P. Orgel and J. D. Schieber (2016). "Nanomechanics of Type I Collagen." Biophys J **111**(1): 50-56.
110. Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.
111. Wierichs, R. J. and H. Meyer-Lueckel (2015). "Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions." J Dent Res **94**(2): 261-271.
112. World Health Organization (2002). Active Ageing: a Policy Framework. Geneva, Switzerland: WHO.

113. Zhang, Y. Z., L. Y. Ran, C. Y. Li and X. L. Chen (2015). "Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases." Appl Environ Microbiol **81**(18): 6098-6107.

## **CAPÍTULO 2 – CONSTRUÇÃO DE CASSETES PARA INATIVAÇÃO DE GENES QUE EXPRESSAM COLAGENASES PUTATIVAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* UA159 EM CÁRIE RADICULAR**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

Desde 1960, o *Streptococcus mutans* ganhou ampla atenção na comunidade científica a partir de estudos clínicos e laboratoriais sobre a patogenicidade do microrganismo em lesões cariosas (Loesche 1986, Nyvad and Kilian 1990). Com o avanço nas técnicas de genética, um maior entendimento de algumas vias metabólicas permitiu que *S. mutans* fosse reconhecido como um organismo importante para lesões de cárie, inclusive as radiculares (Ellen, Banting et al. 1985, Emilson, Klock et al. 1988, Beighton and Lynch 1995). Este organismo faz parte da microbiota bucal e tem sua abundância aumentada em situações de manutenção de baixo pH (Marsh 1994). Diante da disponibilização do genoma completo de *S. mutans* UA159 em 2002 (Ajdic, McShan et al. 2002), a comunidade científica desfrutou ao máximo das técnicas de genômica funcional, abordagens transcriptômicas e proteômicas para entender melhor a fisiologia, genética e mecanismos de virulência de *S. mutans* como organismo modelo de patogenicidade. A cepa UA159 contém todos os genes essenciais para o mecanismo quórum sensing das bactérias e tem sido muito estudada.

Diferentes metodologias são aplicadas no estudo molecular dessa bactéria, que permitem avaliar as consequências de modificações no DNA em *S. mutans* mutantes (Li, Lau et al. 2001, Ahn, Wen et al. 2006, Morrison, Khan et al. 2015). No entanto, além das inúmeras variações de protocolos e a falta de uma técnica padrão para manipulação genética de *S. mutans*, as condições de crescimento que levam ao desenvolvimento espontâneo de competências para transformação não estão bem definidas, mas variações sutis podem ter efeitos profundos nessa característica (Shah and Caufield 1993). Algumas proteases como HtrA and ClpP de outros Gram-positivos já foram, com sucesso, deletadas em protocolos de engenharia genética, mas não com o intuito de avaliar seu papel em doenças bucais como a cárie (Banerjee and Biswas 2008).

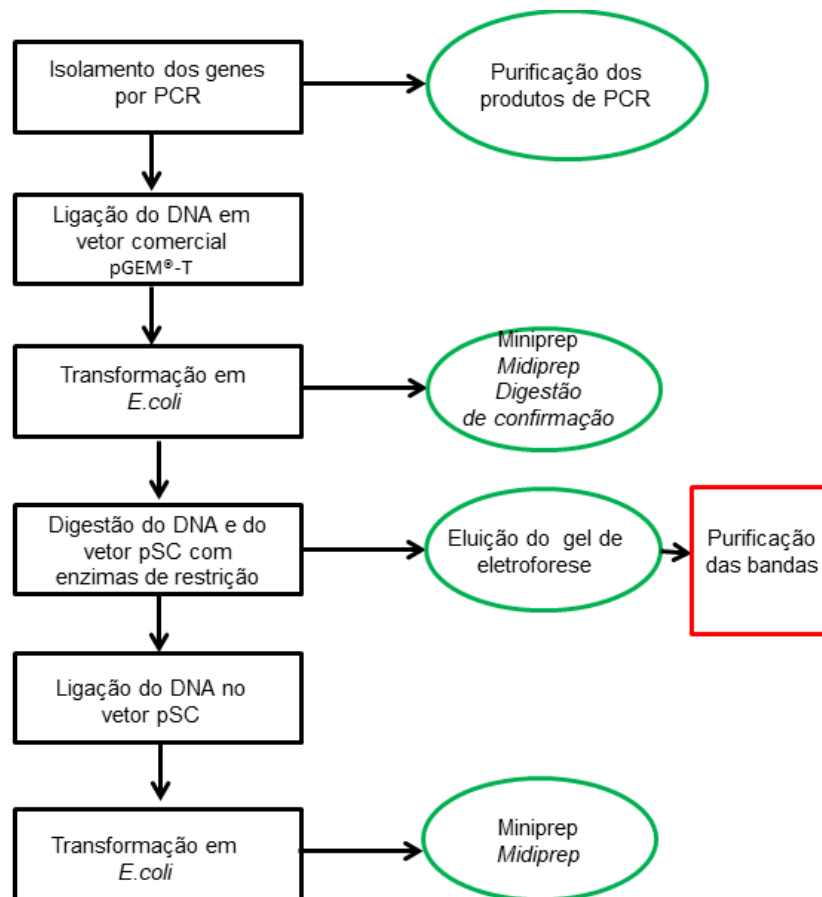
A evolução de técnicas moleculares de sequenciamento também possibilitou a descoberta de uma superexpressão de genes que codificam colagenases possivelmente relacionadas à degradação da matriz orgânica em lesões de cárie dentinária (Simon-Soro, Guillen-Navarro et al. 2014). Apesar de muitos autores não relacionarem o *S. mutans* à degradação da matriz colágena em lesões cavitadas de cárie, um estudo de metatranscritoma demonstrou superexpressão de genes que codificam proteases colagenolíticas bacterianas em biofilme de superfícies radiculares (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018), dentre eles o SMU\_761 e SMU\_759 (*S. mutans* UA159). Ambos os genes codificam a protease tipo colagenase, família PrtC (peptidase U32), capaz de degradar colágeno tipo I, o mais abundante na matriz orgânica dentinária (Ajdić, McShan et al. 2002). Tal achado pode ser interpretado como uma pista do papel dessas proteases na formação da lesão cariosa radicular.

Visto que a atividade colagenolítica também pode ser um importante fator de virulência de *S. mutans* na doença cárie (Takahashi and Nyvad 2011) e diante do pouco conhecimento das funções da bactéria na degradação da matriz colagenolítica, esse estudo objetiva realizar uma manipulação genética do *S. mutans* a partir de técnicas moleculares. Tal manipulação envolve isolamento, clonagem, inibição e posterior avaliação da atividade de genes dessas duas colagenases da cepa UA159. Assim, o conhecimento adquirido com os estudos com *S. mutans* pode ser altamente relevante para outras bactérias Gram-positivas patobiontes, bem como desvendar o real papel dos genes envolvidos com a atividade colagenolítica. Caso comprovado seu envolvimento na formação de lesões cariosas radiculares, esse estudo pode abrir um caminho para o desenvolvimento de novos agentes para o manejo da cárie radicular.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Estratégia

A estratégia utilizada para manipulação dos genes SMU\_761 e SMU\_759 de *S. mutans* UA159 está resumida na figura 1 e será descrita a seguir



**Figura 1-** Fluxograma com a descrição da estratégia de clonagem.

#### 2.2.1.1 Origem do microrganismo e extração do DNA genômico

Neste estudo, os genes de interesse foram amplificados a partir de cepa selvagem de *S. mutans* UA159. As cepas foram gentilmente cedidas pelo prof. Rodrigo Alex Arthur, do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Orais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A cepa foi cultivada em ágar BHI, por 18h, a 37°C em microaerofilia.

O DNA genômico foi extraído como previamente descrito por Do e colaboradores (Do, Gilbert et al. 2010). Brevemente, colônias do microrganismo foram colocadas em 50uL de água ultrapura e friccionadas contra as paredes do tubo eppendorf e agitadas em vórtex. As amostras contendo DNA bacteriano foram usadas diretamente na PCR.

#### 2.2.1.2 Amplificação dos genes de interesse

*Primers* específicos para os genes alvo foram desenhados para isolamento por PCR das regiões codantes de interesse (SMU\_761 e SMU\_759). Para o gene SMU\_759, uma segunda PCR foi realizada utilizando *primers* com sítios de BamHI e EcoRI para que fosse possível a clonagem em um dos vetores (pSC) utilizados no artigo. Foi utilizado o programa integrated DNA Technologies (IDT) para desenho de todos os *primers*, que estão descritos na tabela 1. A tabela 2 apresenta os vetores utilizados no estudo (Os mapas foram construídos com a utilização do programa snapgene - GSL Biotech LLC).

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados como *primers* neste trabalho

<b>Primers</b>	<b>Sequência 5'- 3'</b>
SMU- 761- F	ATGACAAAACAATTTAAAACGCCCAGAAG
SMU- 761- R	TTAAGTTCTAACAGTAAGGCTGCTGC
SMU-759-F	ATGGAAAAAATTGTTATCACTGCGACTG
SMU- 759-R	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT
SMU-759-F ECOBAM	TTCGGGATCCAAGAAATGATGGACAATATTAAC
SMU-759-R ECOBAM	TGGCGGAATTCCAATGATTGTAATGATGATTAATC

**Tabela 2** - Vetores utilizados para clonagem e inativação das collagenases

<b>Vetor</b>	<b>Descrição</b>
pGEM®-T	Vetor para clonagem dos produtos de PCR
PSC	Vetor para inativação das collagenases



As condições de PCR para os genes SMU\_761 e SMU\_759 foram: Taq Platinum 5 U/uL (Invitrogen Inc.), aproximadamente 100 ng de DNA molde, 2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$  e 1,5  $\text{MgCl}_2$  para uma das amostras como forma de testar a eficiência, e 0,2  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, dNTP's mix 0,2 mM. As condições de termociclagem incluíram 36 ciclos (95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto). Foram utilizados volumes de 1  $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$  e 5  $\mu\text{l}$  de DNA template para cada reação, a fim de testar uma otimização das reações. Após, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, onde também foi adicionado um marcador de 1kb (1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Scientific).

As condições de uma segunda PCR para o gene SMU\_759 com os *primers* de extremidades BamHI e EcoRI foram as mesmas. No entanto, a quantidade de Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) utilizada foi de 1,5  $\mu\text{M}$  e, para termociclagem, as condições foram 30 ciclos (95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto). Os amplicons foram, então, analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, com um marcador de 1kb (1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Scientific).

Com a confirmação das bandas positivas e de tamanhos esperados, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) seguindo as orientações do fabricante (Anexo 1). O protocolo inclui ligação, lavagem com etanol e eluição do DNA através de repetidas centrifugações (16000xg).

### 2.2.2 Clonagem no vetor pGEM®-T

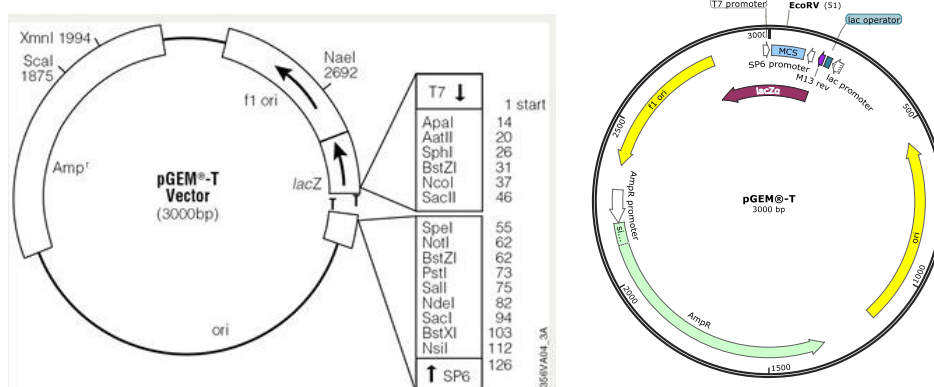
As etapas de clonagem dos fragmentos amplificados compreenderam a ligação e a transformação dos genes, nas condições descritas a seguir:

**Ligação:** Para o sistema de ligação foi utilizado o vetor pGEM®-T (Promega) (Figura 2). Trata-se de um vetor com marca seletiva de ampicilina, que permite seleção de colônias azul/branca, linearizado com uma única timidina no terminal 3' em ambas as extremidades. Neste estudo, os sistemas de ligação foram feitos em volume total de 10  $\mu\text{L}$  com uma proporção molar de vetor: inserto de 1:3 a 1:10. A enzima T4 DNA Ligase foi usada no sistema de

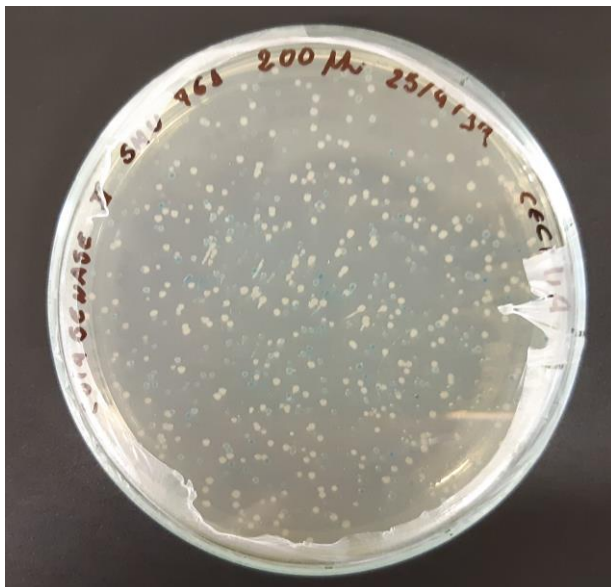
ligação com o tampão fornecido pelo fabricante, e a incubação foi feita a 16 °C por 16 horas (Sambrook and Russel 2001).

**Transformação em *Escherichia coli*:** Foi descongelada uma alíquota de células competentes (XIL10-Gold) retirada do armazenamento a 80 °C. Adicionou-se 10 µL do sistema de ligação às células com posterior incubação em gelo por 30 minutos. Durante 90 segundos foi feito o choque térmico a 42 °C, e em seguida colocadas em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de meio Luria Bertani (LB) e o sistema foi incubado a 37 °C por 1 hora. As células transformadas foram semeadas em meio LB ágar contendo antibiótico (100 µg/mL ampicilina), suplementado com X-Gal (0,004%) e IPTG (0,1 mM) (Sambrook and Russel 2001).

**Seleção dos clones:** A figura 3 demonstra um exemplo de placa positivo para transformação, através da seleção de clones azul/branco. A presença da enzima β-galactosidase no vetor faz com que a colônia da bactéria que contenha o plasmídeo em seu interior seja azul quando os compostos químicos IPTG (isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) estão presentes. O IPTG é uma molécula homóloga da alolactose capaz de produzir a enzima β-galactosidase, degradando o substrato de Xgal, que é um glicosídeo artificial análogo à lactose e um substrato cromógeno para a enzima β-galactosidase, formando consequentemente, a cor azul (Zhang 2016).



**Figura 2:** Mapa do vetor pGEM®-T utilizado no trabalho.



**Figura 3:** Seleção de clones azul e branco.

### 2.2.3 Clonagem no vetor pSC

#### 2.2.3.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição

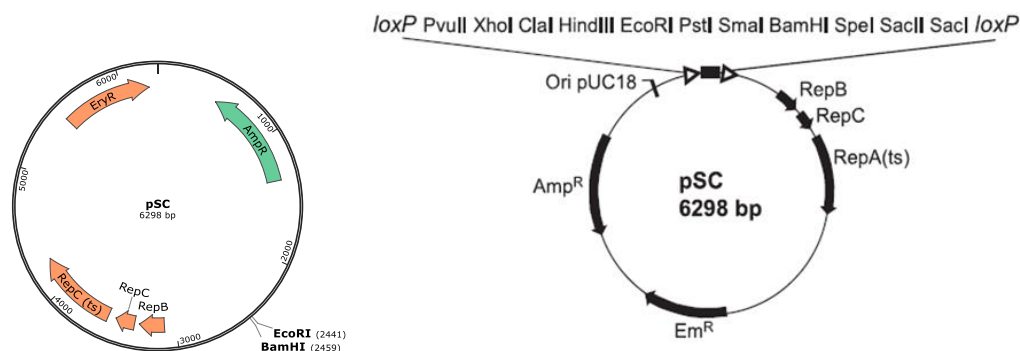
As digestões de DNA são realizadas a fim de fragmentá-lo por catálise da destruição de uma ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos, deixando em suas extremidades fitas simples que permitem a ligação de fragmentos (Loenen and Raleigh 2014). Esse processo é feito a partir de enzimas de restrição ou endonucleases, geralmente produzidas por bactérias. Nesse estudo as digestões foram realizadas em 2h à temperatura adequada com as enzimas EcoRI e BamHI, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

O vetor pSC foi gentilmente cedido por Dr. S.H. Leppla e Dr. A.P. Pomerantsev (NIH/NIAID). As etapas para clonagem no vetor pSC (Figura 4) (Pomerantsev, Camp et al. 2009) foram as mesmas realizadas na clonagem do primeiro vetor: ligação e transformação nas condições descritas a seguir:

**Ligação:** Para o sistema de ligação foi utilizado o vetor pSC. É um vetor com marca seletiva de ampicilina e eritromicina que não permite seleção azul/branca, derivado do vetor pXO1 com sítio de PvuII de pUC18 inserido em sua conformação. Nesta etapa, os sistemas de ligação também foram feitos em volume total de 10  $\mu$ L com uma proporção molar de vetor: inserto de 1:3 a 1:10. As ligações usaram a enzima T4 DNA Ligase (USB) e a incubação foi feita a 16  $^{\circ}$ C (no caso de extremidades abruptas) por 16 horas (Sambrook and Russel 2001).

**Transformação em *E. coli*:** Foi descongelada uma alíquota de células competentes retirada do armazenamento a 80  $^{\circ}$ C. Adicionou-se 10  $\mu$ L do sistema de ligação às células com posterior incubação em gelo por 30 minutos. Durante 90 segundos foi feito o choque térmico a 42  $^{\circ}$ C, e em seguida colocadas em gelo por 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio Luria Bertani (LB) e o sistema foi incubado a 37  $^{\circ}$ C por 1 hora. As células transformadas foram semeadas em meio LB ágar contendo antibiótico (100  $\mu$ g/mL ampicilina), (Sambrook and Russel 2001).

**Transformação em *S. mutans*:** Após a montagem em *E. coli* dos vetores com os fragmentos das collagenases SMU\_761 e SMU\_759, o passo seguinte seria a transformação em *S. mutans* para a obtenção dos clones mutantes, à qual não resultou em clones verdadeiros. Foram testados protocolos de eletroporação e por indução com peptídeo sintético.

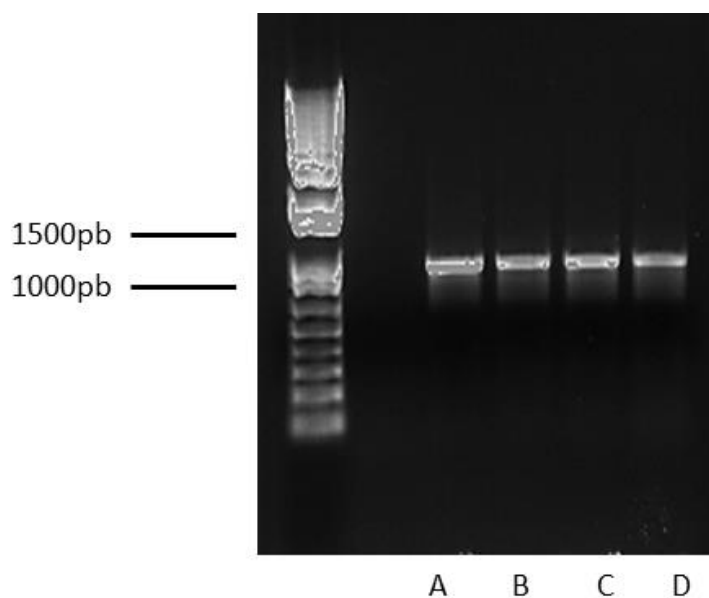


**Figura 4** - Mapa do vetor pSC utilizado no trabalho. Cedido por: Dr. S.H. Leppla e Dr. A.P. Pomerantsev (NIH/NIAID).

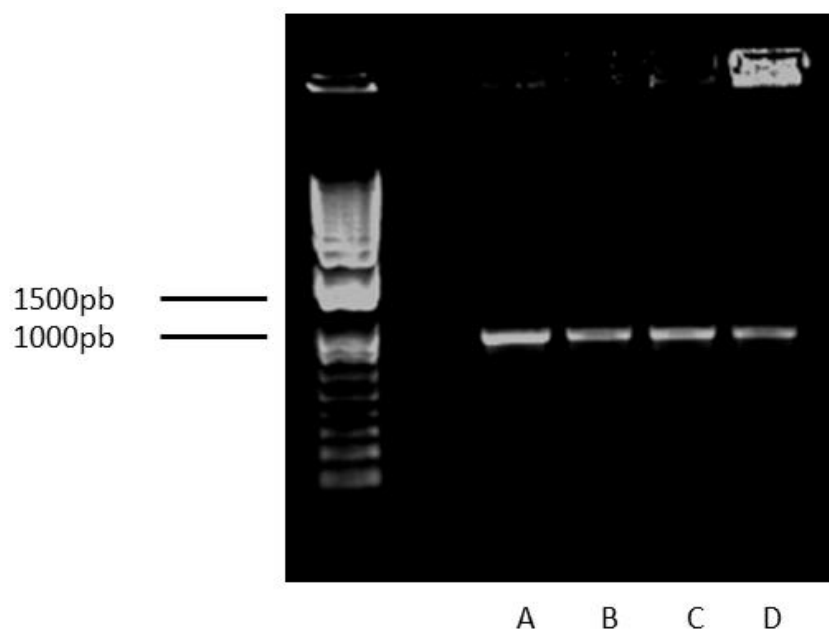
## 2.3 RESULTADOS:

### 2.3.1. Amplificação dos genes de interesse

As concentrações de  $MgCl_2$  testadas tiveram resultado positivo para amplificação dos genes estudados, assim como os diferentes volumes de DNA testados, mostrando que qualquer um dos 3 volumes poderia ser utilizado. Após amplificação, verificou-se bandas com tamanhos coincidentes ao esperado dos genes SMU\_761 e SMU\_759 no gel de agarose (Figuras 5 e 6), de 1287pb para o gene SMU\_761 e 927 pb para o gene SMU\_759.

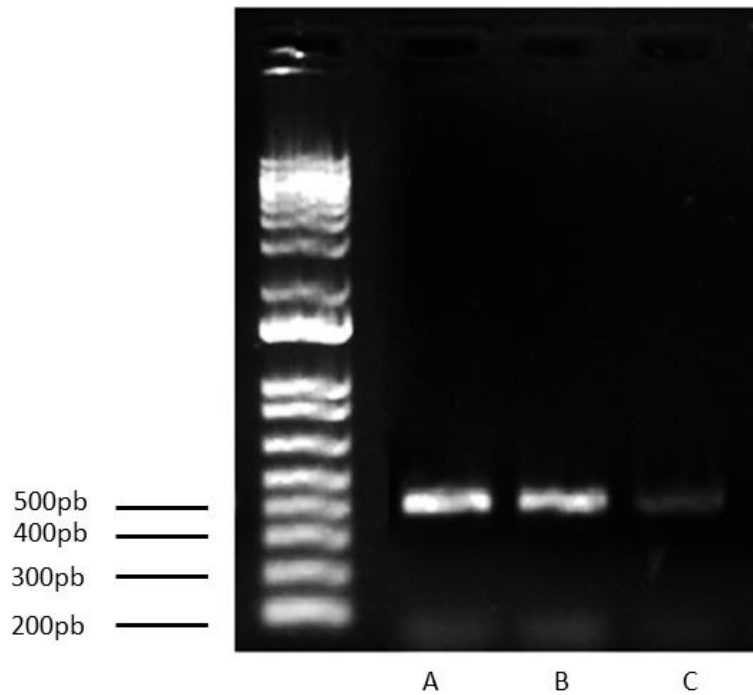


**Figura 5** - Gel de eletroforese referente à amplificação por PCR do gene SMU\_761 (A – template DNA 2,5 $\mu$ M de  $MgCl_2$ , B - template DNA 1 $\mu$ l, C - template DNA 3 $\mu$ l, D- template DNA - 5 $\mu$ l).



**Figura 6** - Gel de eletroforese referente à amplificação por PCR do gene SMU\_759 (A – template DNA 2,5 $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub>, B - template DNA 1 $\mu$ l, C - template DNA 3 $\mu$ l, D- template DNA - 5 $\mu$ l).

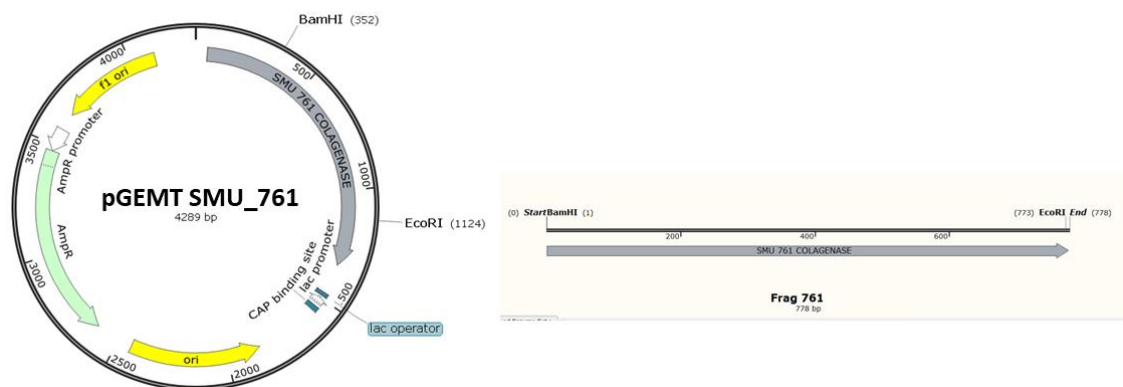
Para a segunda PCR do gene SMU\_759, com sítios de BamHI e EcoRI, esperava-se uma amplificação em 538pb (Figura 7). Esta PCR foi necessária, pois a etapa seguinte envolveria a clonagem do fragmento no vetor pSC, após a montagem deste gene no vetor pGEM®-T. Entretanto, as sequências não apresentavam sítios de restrição compatíveis com o vetor de destino ou com os tamanhos de fragmento desejados. Para contornar este problema, foram desenhados primers que adicionavam sítios de restrição para as enzimas BamHI e EcoRI.



**Figura 7** - Gel de eletroforese referente à amplificação por PCR do gene SMU\_759 com sítios de restrição BamHI e EcoRI (A, B e C possuem a mesma reação de PCR com 2µl de DNA template). A reação foi repetida em triplicata para que fosse obtida maior quantidade de material para a próxima fase.

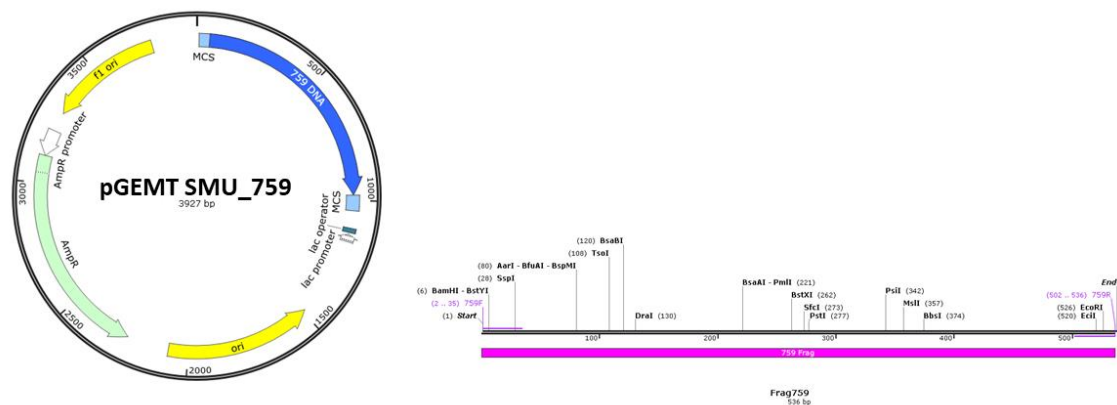
### 2.3.2 Clonagem no vetor pGEM®-T

A clonagem com o vetor pGEM®-T gerou um plasmídeo de 4289pb para o gene SMU\_761 e 3927 pb para o gene SMU\_759. As informações e características dos dois plasmídeos são semelhantes (Figura 8A e 8B).



A

**Figura 8A** - Plasmídeo resultante da inserção do fragmento de colagenase SMU\_761 no vetor pGEM®-T(A) e da inserção do fragmento de colagenase SMU\_759 no vetor pGEM®-T(B).



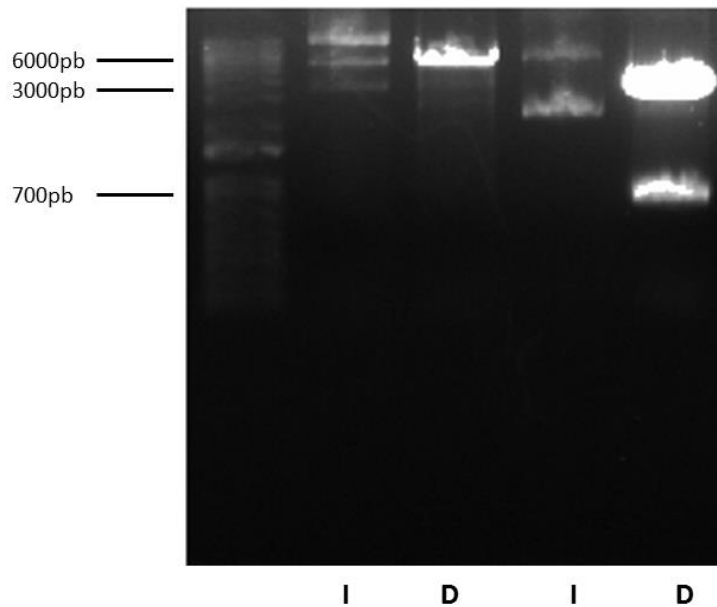
B

**Figura 8B** - Plasmídeo resultante da inserção do fragmento de colagenase SMU\_761 no vetor pGEM®-T(A) e da inserção do fragmento de colagenase SMU\_759 no vetor pGEM®-T(B).

### 2.3.2.1 Confirmação da clonagem do fragmento no vetor pGEM®-T por digestão com enzimas de restrição

Para demonstrar o sucesso da primeira clonagem, realizou-se a digestão do vetor formado (pGEM®-T SMU\_761) com as enzimas BamHI e EcoRI (Figura 9). O tamanho das bandas esperadas era de 778pb para o fragmento e 3000pb para o vetor. Para o vetor pGEM®-T SMU\_759 não foi necessária essa confirmação por digestão, pois a etapa de amplificação do gene foi realizada já com os sítios das enzimas e confirmada por PCR. Para dar seguimento a clonagem no próximo vetor (pSC), este foi digerido com as mesmas enzimas para utilização no sistema de ligação, com tamanho de banda esperada de 6298pb(Figura 9).





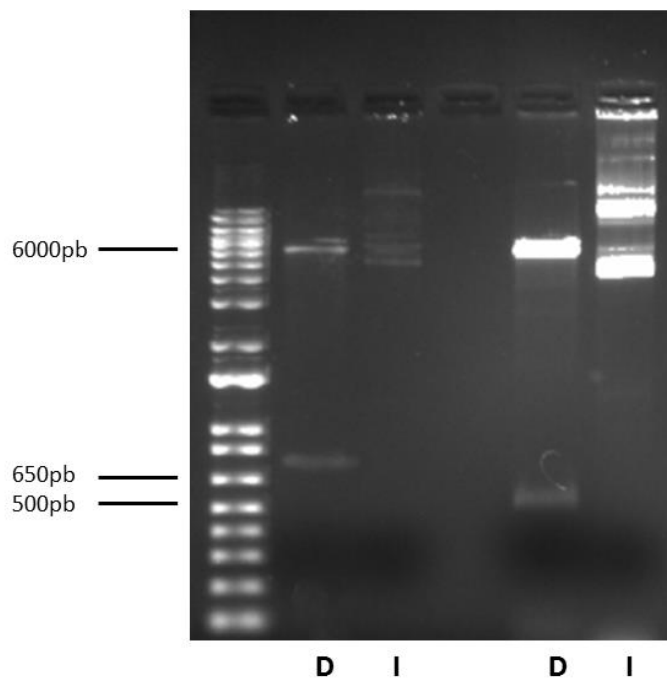
**Figura 9:** Gel de eletroforese referente à digestão do vetor pSC e do vetor pGEM®-T SMU\_761: intacto pSC, digerido pSC, intacto pGEM®-T SMU\_761, digerido pGEM®-T SMU\_761.

### 2.3.3 Clonagem no vetor pSC

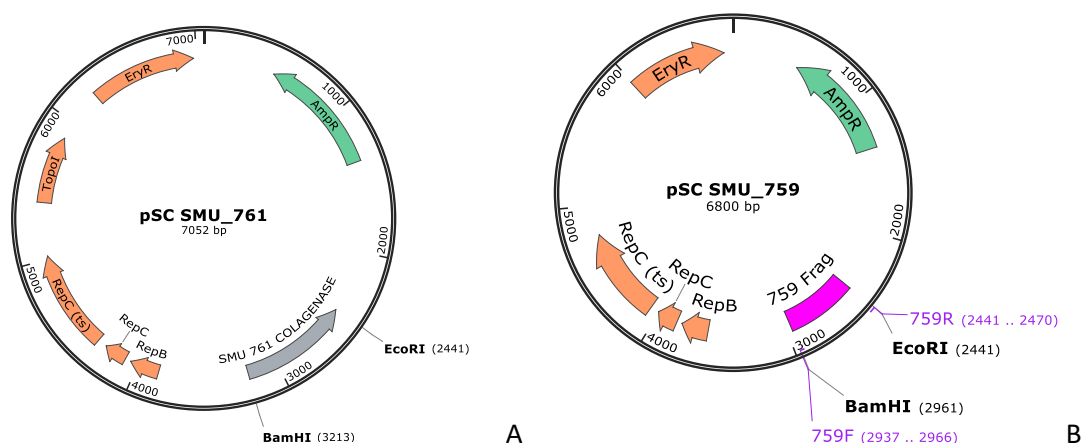
#### 2.3.3.1 Confirmação da clonagem dos fragmentos no vetor pSC por digestão com enzimas de restrição

A montagem final dos vetores pSC SMU\_761 e pSC SMU\_759 foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI. O tamanho das bandas esperadas para a digestão pSC SMU\_761 era de 778pb para o fragmento e 6298pb para o vetor. Para a digestão pSC SMU\_759, as bandas esperadas eram de 538 pb para o fragmento e 6298pb para o vetor (Figura 10).

Após a digestão do plasmídeo e do DNA com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI e junção no sistema de ligação, a clonagem com o vetor pSC gerou um plasmídeo de 7052pb para o gene SMU\_761 e 6800pb para o gene SMU\_759, inserido entre as enzimas BamHI e EcoRI do vetor (Figura 11).



**Figura 10** - Gel de eletroforese referente à digestão dos vetores formados no trabalho: pSC SMU\_761 digerido, pSC SMU\_761 intacto, pSC SMU\_759 digerido, pSC SMU\_759 intacto.



**Figura 11** - Plasmídeo resultante da inserção do fragmento de colagenase SMU\_761 (A) e SMU\_759 (B) no vetor pSC.

### 2.3.4 Transformação em *Streptococcus mutans*

Apesar de vários protocolos serem inicialmente testados, não obtivemos sucesso na transformação. Os clones obtidos não eram verdadeiros, após testes com PCR para confirmação da modificação genética. Foram testados protocolos com CSPs sintéticos (peptídeo estimulador de competência), pois autores descreveram que a dependência de fatores ambientais para atingir níveis de competência eficientes está, em parte, relacionada à capacidade das células de produzir e secretar o feromônio CSP (Morrison 1997, Petersen and Scheie 2010). Outra alternativa estava em um protocolo com transformação por eletroporação com utilização de meio HEPES e glicerol 15% (Loimaranta, Tenovuo et al. 1998). Uma terceira tentativa incluiu experimentos com soro fetal bovino, a partir de uma adaptação do protocolo criado por Sang-Joon (Ahn, Wen et al. 2006). Todos os protocolos citados foram testados de maneira fiel ou com pequenas adaptações (para que fosse possível reproduzir no laboratório), no entanto, mesmo com o crescimento de colônias nas placas de transformação, muitas vezes cresciam também colônias nas placas de controle negativo. Ou, quando testados os clones “transformados” por PCR com primers para collagenases ou eritromicina/ampicilina (marcas de seleção do plasmídeo pSC), o resultado era negativo. Vários testes de possíveis impasses foram avaliados, dentre eles: teste de concentração de antibiótico, teste de meios de cultura favoráveis ao *S. mutans* (BHI, HEPES ou TSB), teste de temperatura de crescimento (30 ou 37 graus) e teste de tempo de incubação (de 24 até 72h).

A Figura 12 representa exemplos de placas com resultados negativos ou clones falsos a partir da tentativa de transformação dos vetores montados em *S. mutans*.



**Figura 12** – Placas representativas do protocolo de transformação em *S. mutans*.

## 2.4 DISCUSSÃO

Considerando os diferentes mecanismos envolvidos no desenvolvimento das lesões cariosas radiculares, o *S. mutans* e suas proteases, especialmente colagenases, foram estudados e descritos com potencial papel na fase de degradação da matriz colagenolítica em cárie radicular (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2018). Diante disso, o objetivo desse estudo foi realizar uma manipulação genética de duas colagenases putativas do *S. mutans* UA159, codificadas pelos genes SMU\_761 e SMU\_759 (família PrtC - peptidase U32), capazes de degradar colágeno tipo I. Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de manipulação dos mesmos e uma possível importância no genoma pela dificuldade de transformação. As clonagens das colagenases em vetores integrativos e passíveis de interrupção da atividade dos genes foram realizadas com sucesso e são passos indispensáveis para futura transformação do microrganismo e obtenção de *S. mutans* mutantes.

Algumas pesquisas dedicam-se ao estudo genético e manipulação de microrganismos Gram-positivos, mas este é o primeiro estudo manipulando as colagenases SMU\_759 e SMU\_761 do genoma da cepa UA159. Esse genoma foi completamente descrito por Adjic e colaboradores (Adjic, McShan et al. 2002), que sugeriu o papel de tais genes como colagenases U32. Como descrito anteriormente, algumas proteases de *S. mutans*, como HtrA and ClpP já foram, com sucesso, deletadas com uso de plasmídeos comerciais e construídos individualmente (Banerjee and Biswas 2008). No entanto, na maioria das vezes não é possível aplicar o mesmo protocolo em genes diferentes, pois nesses casos, as sequências no genoma são específicas para cada gene codificador de proteases e alguns podem ser essenciais para a sobrevivência do microrganismo. Isso indica a importância de desenvolver protocolos padronizados para o organismo em questão.

A amplificação dos genes estudados mostrou que, independente da quantidade de DNA ou MgCl<sub>2</sub> utilizado, foi possível isolá-los com facilidade. Isso reforça a presença e sugere importância dos genes na bactéria. Os resultados do isolamento e digestão, além de confirmarem a presença dos genes, asseguram que a metodologia foi realizada corretamente e permite que

os próximos passos possam ser realizados, como a transformação em *S. mutans*.

Para que a clonagem fosse possível, dois vetores foram necessários, sendo o primeiro comercial (pGEM®-T), típico de clonagem, cuja função é carregar o fragmento de interesse e replicá-lo múltiplas vezes sem ocasionar alterações na sequência alvo. O segundo vetor (pSC), foi cedido por pesquisadores do NIH (National Institutes of Health) que construíram o plasmídeo individualmente para um estudo com a bactéria *Bacillus anthracis* (Pomerantsev, Camp et al. 2009). A clonagem no pSC permite a interrupção das colagenases e consequente inativação de sua atividade.

Diversos estudos já transformaram o *S. mutans* com sucesso (Ahn, Wen et al. 2006, Banerjee and Biswas 2008, Morrison, Khan et al. 2015). No entanto, não há protocolo definido e normalmente os mesmos objetivam outras alterações, como deleção de múltiplos genes ou transformação de cepas que não sejam UA159. Os estudos baseados em engenharia genética mostram protocolos com reagentes, concentrações e técnicas divergentes, e dificilmente são relacionados à cariologia. Além das inúmeras variações de protocolos e a falta de uma técnica padrão, as condições de crescimento que levam ao desenvolvimento espontâneo de competências para transformação não estão bem definidas, mas variações sutis podem ter efeitos profundos na capacidade de desenvolver competência (Shah and Caufield 1993). Isso significa que mesmo com a aplicação de diferentes técnicas de transformação, não é garantida a obtenção final de clones verdadeiros. Há necessidade de realizar novas pesquisas que busquem estudar geneticamente microrganismos envolvidos na doença cárie, a fim de aprimorar e criar novos tratamentos.

Conclui-se que os genes SMU\_759 e SMU\_761 são de fácil manipulação, porém, que pode haver importância no genoma pela dificuldade de transformação no *S. mutans*. As perspectivas desse estudo consideram a transformação e teste dos mutantes com as colagenases inativadas para avaliar se existe real influência na formação de lesões cariosas radiculares. Os resultados são essenciais para futura confirmação da função colagenolítica e cariogenicidade em lesões radiculares, como possibilidade de proposta de novos tratamentos.

## 2.5 REFERÊNCIAS

1. Ahn, S. J., Z. T. Wen and R. A. Burne (2006). "Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159." Infect Immun **74**(3): 1631-1642.
2. Ahn, S. J., Z. T. Wen and R. A. Burne (2006). "Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159." Infect Immun **74**(3): 1631-1642.
3. Ajdic, D., W. M. McShan, R. E. McLaughlin, G. Savic, J. Chang, M. B. Carson, C. Primeaux, R. Tian, S. Kenton, H. Jia, S. Lin, Y. Qian, S. Li, H. Zhu, F. Najjar, H. Lai, J. White, B. A. Roe and J. J. Ferretti (2002). "Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14434-14439.
4. Ajdić, D., W. M. McShan, R. E. McLaughlin, G. Savić, J. Chang, M. B. Carson, C. Primeaux, R. Tian, S. Kenton, H. Jia, S. Lin, Y. Qian, S. Li, H. Zhu, F. Najjar, H. Lai, J. White, B. A. Roe and J. J. Ferretti (2002). "Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14434-14439.
5. Banerjee, A. and I. Biswas (2008). "Markerless multiple-gene-deletion system for *Streptococcus mutans*." Appl Environ Microbiol **74**(7): 2037-2042.
6. Beighton, D. and E. Lynch (1995). "Comparison of selected microflora of plaque and underlying carious dentine associated with primary root caries lesions." Caries Res **29**(2): 154-158.
7. Birkedal-Hansen, H. (1993). "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases." J Periodontol **64**(5 Suppl): 474-484.
8. Damé-Teixeira, N., C. C. F. Parolo and M. Maltz (2017). "Specificities of Caries on Root Surface." Monogr Oral Sci **26**: 15-25.
9. Damé-Teixeira, N., C. Parolo, M. MALTZ, A. RUP, D. Devine and T. Do (2018). "Gene expression of bacterial collagenolytic proteases in root caries." Journal of Oral Microbiology **10**: 1424475.
10. Do, T., S. C. Gilbert, D. Clark, F. Ali, C. C. Fatturi Parolo, M. Maltz, R. R. Russell, P. Holbrook, W. G. Wade and D. Beighton (2010). "Generation of diversity in *Streptococcus mutans* genes demonstrated by MLST." PLoS One **5**(2): e9073.
11. Ellen, R. P., D. W. Banting and E. D. Fillery (1985). "*Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk." J Dent Res **64**(10): 1245-1249.

12. Emilson, C. G., B. Klock and C. B. Sanford (1988). "Microbial flora associated with presence of root surface caries in periodontally treated patients." Scand J Dent Res **96**(1): 40-49.
13. Fejerskov, O. (2004). "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care." Caries Res **38**(3): 182-191
14. Hoppenbrouwers, P. M., F. C. Driessens and J. M. Borggreven (1986). "The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization." J Dent Res **65**(7): 955-958.
15. Li, Y. H., P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen and D. G. Cvitkovitch (2001). "Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms." J Bacteriol **183**(3): 897-908.
16. Lingström, P. and D. Birkhed (1994). "Effect of buccal administration of a lactose-containing nitroglycerin tablet (Suscard) on plaque pH." Scand J Dent Res **102**(6): 324-328.
17. Loenen, W. A. and E. A. Raleigh (2014). "The other face of restriction: modification-dependent enzymes." Nucleic Acids Res **42**(1): 56-69.
18. Loesche, W. J. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." Microbiol Rev **50**(4): 353-380.
19. Loimaranta, V., J. Tenovu, L. Koivisto and M. Karp (1998). "Generation of Bioluminescent *Streptococcus mutans* and Its Usage in Rapid Analysis of the Efficacy of Antimicrobial Compounds." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 1906-1910.
20. Marsh, P. D. (1994). "Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease." Adv Dent Res **8**(2): 263-271.
21. Meyer-Lueckel, H. and S. Paris (2016). "When and How to Intervene in the Caries Process." Oper Dent **41**(S7): S35-s47
22. Morrison, D. A., R. Khan, R. Junges, H. A. Åmdal and F. C. Petersen (2015). "Genome editing by natural genetic transformation in *Streptococcus mutans*." J Microbiol Methods **119**: 134-141.
23. Nyvad, B. and M. Kilian (1990). "Microflora associated with experimental root surface caries in humans." Infect Immun **58**(6): 1628-1633.
24. Paim, J., C. Travassos, C. Almeida, L. Bahia and J. Macinko (2011). "The Brazilian health system: history, advances, and challenges." Lancet **377**(9779): 1778-1797.
25. Petersen, F. C. and A. A. Scheie (2010). "Natural transformation of oral streptococci." Methods Mol Biol **666**: 167-180.

26. Pomerantsev, A. P., A. Camp and S. H. Leppla (2009). "A new minimal replicon of *Bacillus anthracis* plasmid pXO1." J Bacteriol **191**(16): 5134-5146.
27. Sambrook, J. and D. Russell (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
28. Shah, G. R. and P. W. Caufield (1993). "Enhanced transformation of *Streptococcus mutans* by modifications in culture conditions." Anal Biochem **214**(1): 343-346.
29. Simon-Soro, A., M. Guillen-Navarro and A. Mira (2014). "Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions." Journal of Oral Microbiology **6**.
30. Takahashi, N. and B. Nyvad (2011). "The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives." J Dent Res **90**(3): 294-303.
31. Tjaderhane, L., M. A. Buzalaf, M. Carrilho and C. Chaussain (2015). "Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'." Caries Res **49**(3): 193-208.
32. Zhang, Y. S. (2016). "Blue-white screening liquid can eliminate false positives in blue-white colony screening." Genet Mol Res **15**(2).



## CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

### 3.1 DISCUSSÃO GERAL

A transição epidemiológica encontrada em diversos países nos últimos anos, inclusive no Brasil, permitiu uma mudança nas taxas de mortalidade e consequente aumento da expectativa de vida (Paim, Travassos et al. 2011). Melhorar a qualidade de vida em uma população inclui destinar atenção para saúde bucal. Diante disso, é comum que adultos e idosos permaneçam com maior proporção de dentes em boca e, conseqüentemente, maior susceptibilidade a exposição de raízes dentárias (Hoppenbrouwers, Driessens et al. 1986). Lesões cariosas radiculares são, muitas vezes, encontradas nessas raízes que não estão naturalmente preparadas para suportarem o desafio cariogênico do ambiente bucal. Diferentemente do esmalte, a estrutura radicular é rica em componentes orgânicos, como o colágeno, característica que propicia uma região mais friável e menos resistente aos episódios de desmineralização (Damé-Teixeira, Parolo et al. 2017).

O tratamento de cárie radicular tornou-se um grande desafio na odontologia devido ao aumento no número de casos e ao insucesso das técnicas restauradoras. Métodos invasivos e não invasivos são estudados, mas ainda não existe um padrão ouro comprovado cientificamente para ser aplicado no dia a dia clínico (Meyer-Lueckel and Paris 2016). Nesse contexto, compreender a etiologia da doença é o passo inicial para futuramente escolher o melhor manejo possível das lesões cariosas radiculares. Como foi explicado nessa dissertação, as diferenças bioquímicas associadas ao desenvolvimento de lesões cariosas radiculares implicam em duas prováveis fases de desenvolvimento: desmineralização e degradação da matriz orgânica (Nyvad and Fejerskov 1990). Na segunda fase, a presença de metaloproteinases ainda é pouco estudada, mas sugere grande influência dessas proteases, principalmente colagenases, na degradação de colágeno de raízes radiculares. A partir da restrita informação científica disponível, associada aos achados do estudo de Damé-Teixeira e colaboradores, que mostraram superexpressão de genes em *S. mutans* relacionados à atividade proteolítica bacteriana, ainda

desconhecida em cárie radicular, apresenta-se a necessidade de analisar esse microrganismo biomolecularmente e manipulá-lo a fim de construir mutantes que tenham essas collagenases inativadas.

Inativar as collagenases significa criar uma possibilidade de, *in vitro*, desenvolver lesões artificiais com cepas selvagens e mutadas, analisando microscopicamente as diferenças no padrão de formação de cada uma. Esse é o próximo passo dessa linha de pesquisa. Após a construção dos plasmídeos mostrados nesse trabalho, capazes de interromper tais proteases, a etapa seguinte consiste em protocolos de transformação de *S. mutans* que permitirão o desenvolvimento de bactérias mutantes. Estudos sobre transformação dessa bactéria e outras Gram-positivas já foram selecionados como base e os testes iniciais de transformação estão em andamento. Apesar disso, a transformação de *S. mutans* parece não ser simples e demanda uma grande quantidade de protocolos e métodos até que seja estabelecido o mais eficaz.

Com a obtenção desses mutantes, a etapa de desenvolvimento *in vitro* das lesões terá como colaboração a equipe do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Bucal (LABIM - UFRGS), que já possui uma metodologia de crescimento de biofilme em discos de dentina bovina. Para isso, foi realizado um treinamento da equipe desse trabalho, capacitando a reprodução do protocolo. Por fim, independentemente do resultado das lesões com cepas mutadas, a manipulação genética de um microrganismo considerado agente etiológico da doença cárie, será um avanço nos estudos de cariologia e poderá gerar um novo protocolo de manipulação genética e transformação de *S. mutans* com a utilização de novos plasmídeos (Pomerantsev, Camp et al. 2009), ainda não utilizados para tal organismo.

### 3.2 CONCLUSÕES

Em conclusão, com relação a revisão de literatura sobre cárie radicular e ao artigo sobre análise genética de duas colagenases putativas de *Streptococcus mutans* UA159 presentes em cárie radicular, seguem os pontos-chaves observados:

1. A cárie radicular tornou-se um desafio na odontologia devido a sua alta taxa de prevalência e de insucesso dos tratamentos restauradores. Com a transição epidemiológica em percurso, os casos de pacientes idosos com dentes retidos em boca acometidos por lesões cariosas radiculares tende a aumentar;
2. Um dos grandes problemas da doença tem relação com o desafio clínico para seu tratamento. A diferença dos substratos coronário e radicular tem influência na adesão e retenção dessas restaurações. Isso demonstra a necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos;
3. Embora o papel das colagenases do hospedeiro seja bem descrito em doença cárie, não é sabido ainda o verdadeiro papel bacteriano neste processo de degradação da parte orgânica das superfícies radiculares. Entender como essas proteases funcionam no desenvolvimento da doença é essencial para futuras aplicações científicas em tratamentos para cárie radicular;
4. Técnicas de modificações de DNA do microrganismo *S. mutans* são de extrema importância para análises e identificação da ação de proteases do microrganismo e são insubstituíveis para estudos posteriores. Devido a dificuldade na transformação e inserção de plasmídeos em células de *S. mutans*, novos protocolos padronizados para tal serão importantes para avanços na área de microbiologia da cárie.

## **CAPÍTULO 4 – PRESS RELEASE**

O aumento da expectativa de vida visto nos últimos anos elevou o número da população idosa em nível mundial. Essa transição trouxe mudanças na qualidade de vida dessa população, incluindo alterações bucais importantes, com destaque para menor perda de dentes com o avançar da idade. No entanto, outra condição frequentemente vista nesses pacientes idosos é a cárie radicular (lesões que se desenvolvem na margem da gengiva, onde há exposição da raiz do dente). A cárie radicular tornou-se um desafio na Odontologia devido a sua alta taxa de prevalência e de insucesso nos tratamentos. A formação das lesões cariosas, não só radiculares, acontece naqueles indivíduos que, além de uma dieta rica em carboidratos fermentáveis, possuem uma higiene bucal deficiente. Nessa situação, as bactérias encontram um ambiente propício para atuarem sobre os constituintes dentários. Inicia-se então, o processo de acidificação do meio bucal e destruição dos tecidos dentários com perda de componentes minerais e orgânicos. Para cárie radicular, esse processo parece ocorrer em duas fases distintas: perda de minerais do dente e perda da parte orgânica do dente. Nessa última, a função das bactérias ainda é pouco conhecida, mas estudos sugerem que proteases, um importante grupo de enzimas, estejam envolvidas nesse processo, com destaque para duas proteases que degradam colágeno, chamadas collagenases. Nesse estudo, essas proteases foram avaliadas geneticamente, constituindo o passo inicial para entender o papel dessas enzimas em cárie radicular e possibilitar o desenvolvimento de novos tratamentos.

## ANEXOS

## Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, A9282, AND A9285.

**Quick  
PROTOCOL**

### DNA Purification by Centrifugation

#### Gel Slice and PCR Product Preparation

##### A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10µl Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

##### B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

#### Binding of DNA

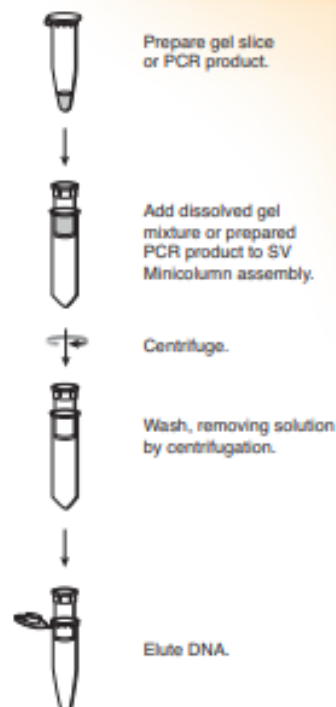
1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at 16,000 × *g* for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

#### Washing

4. Add 700µl Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at 16,000 × *g* for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500µl Membrane Wash Solution. Centrifuge at 16,000 × *g* for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

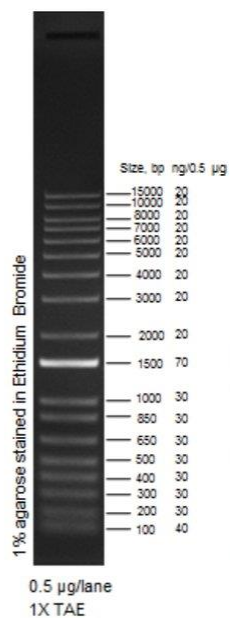
#### Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50µl of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 16,000 × *g* for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.

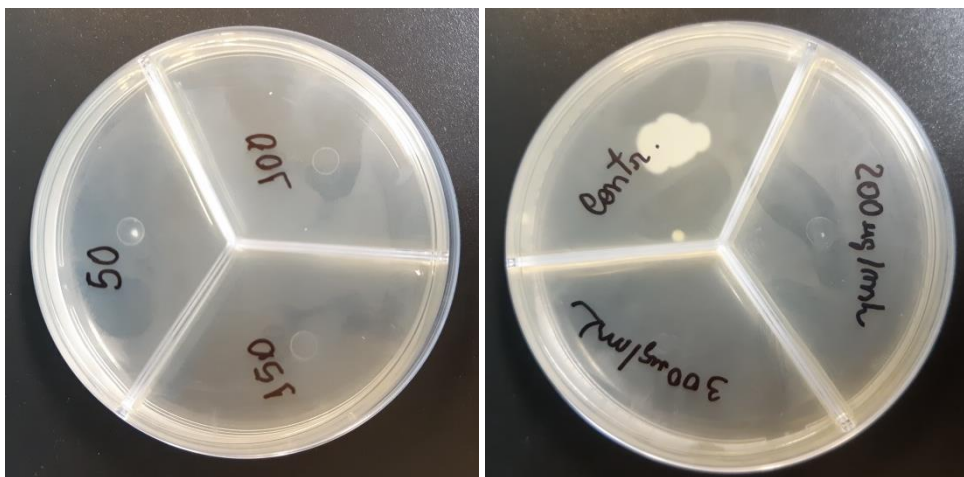


3760MA07\_2A

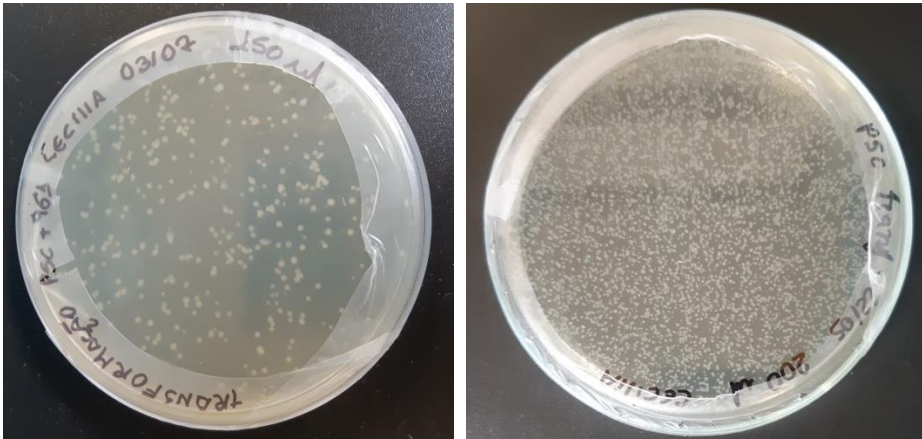
Anexo 1 - Passo a passo do kit de purificação de DNA.



**Anexo 2** - Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Padrão de tamanho dos fragmentos.



**Anexo 3** – Teste de diferentes concentrações de eritromicina para transformação de *S. mutans*.



**Anexo 4** – Placas com algumas das transformações feitas durante o trabalho.



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

#### CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

Certifico que ISABELA MONICI SILVA e CECILIA DE BRITO BARBOSA participaram da visita técnica para treinamento sobre análise de matriz colágena presente em amostra de dentina após indução de lesão de cárie, realizado no período de 09 a 20 de dezembro de 2019 na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Buciais.

Porto Alegre; 16 de janeiro de 2020

---

Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur  
 Professor Adjunto IV  
 Departamento de Odontologia Preventiva e Social  
 Faculdade de Odontologia  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Anexo 5** – Certificado de participação em visita técnica ao laboratório de Bioquímica e Microbiologia bucais da UFRGS.

## LISTA DE REAGENTES E EXPERIMENTOS

### **Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)**

Este é um passo a passo feito de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel 2001, com adaptações. Uma colônia isolada da placa de transformantes foi inoculada em 5 mL de meio LB com ampicilina este inóculo foi inculado a 37 °C por 16 horas sob agitação. As células de 2 mL de cultura foram coletadas por centrifugação a 10000 x *g* por 2 minutos e o precipitado foi ressuspendido em 200 µL de solução I. Foram adicionados 360 µL de solução II (recém-preparada) para celular, e a amostra incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, 300 µL de solução III gelada foi adicionada e a mistura foi incubada por 5 minutos em gelo. A amostra foi centrifugada a 10000 x *g* por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. O sobrenadante foi adicionado a 750 µL de isopropanol, homogeneizado e centrifugado a 10000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de solução I. Posteriormente, foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e a amostra foi homogeneizada em agitador do tipo vórtice. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000 x *g* por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado com adição de 750 µL de etanol 100% gelado. O passo seguinte incluiu a centrifugação a 10000 x *g* por 5 minutos, o descarte do sobrenadante e uma lavagem com 500 µL de etanol 70% gelado. Foi feita uma última centrifugação a 10000 x *g* por 2 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado foi então seco em um concentrador a vácuo. O precipitado foi então ressuspendido em 50 µL de água milliQ contendo RNase A (20 µg/mL) e incubado a 37 °C por 15 minutos. O DNA foi armazenado a -20 °C.

### **Preparação de DNA plasmidial em grande escala (midiprep)**

Este é um protocolo adaptado para o kit Qiagen Plasmid Midi and Maxi (Qiagen). Primeiramente, colher cultura bacteriana durante a noite em erlemeyer e despejá-la em 4 falcons de 50 ml cada (25 ml de cultura em cada um), centrifugar a 6000 x *g* durante 15 minutos a 4 ° C. Ressuspender o pellet bacteriano em 4 ml de TE no primeiro falcon e ir passando para os outros tubos até restar 1 tubo. Adicionar 4 ml da solução 2, misturar invertendo



vigorosamente o tubo de 4–6 vezes e incubar à temperatura ambiente (15–25 ° C) por 5 minutos. Adicionar 4 ml de solução 3 , misturar vigorosamente invertendo 4-6 vezes. Incubar no gelo por 15 minutos. Posteriormente, centrifugar a  $\geq 20.000 \times g$  durante 30 minutos a 4 ° C e re-centrifugar novamente nas mesmas condições por 15 minutos. Passar o sobrenadante para outro tubo e adicionar a solução fenol-clorofórmio (1-1 fenol equilibrado, fase de baixo, em cima está o tampão). A cada 12ml de sobrenadante, colocar 10ml da solução e vortexar o falcon por 1 minuto. Em seguida, centrifugar 5000 x g por 10 minutos. Pegar com pipeta a fase de cima, sem puxar a interfase e sem pegar sujeira e passar para outro tubo. Precipitar com no mínimo 0,54v de isopropanol, invertendo o tubo várias vezes. Para cada 10ml do líquido , colocar 7,5ml de isopropanol. Centrifugar 20.000 x g por 10 minutos e descartar o sobrenadante. Lavar com 4ml de etanol 70% sem inverter ou misturar , centrifugar a 20.000 x g por 10 minutos e descartar o sobrenadante. .Secar o pellet e ressuspendê-lo em água pura +RNase (100mg/ml) volume final = 200( 190 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milique para 10 $\mu$ l de RNase). Incubar por 2 horas a 37 ° C.

### **Eluição do gel de eletroforese**

Consiste no “corte das bandas” do gel de eletroforese com auxílio de lâmina de bisturi, após a digestão com enzimas de restrição, seguido por purificação com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) seguindo as orientações do fabricante e utilização do produto final no sistema de ligação.

### **Enzimas utilizadas no trabalho**

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- T4 DNA ligase
- BamHI (G'GATCC)
- EcoRI ( G'AATTC)

### **Bactérias**

- *Escherichia coli XL10-Gold*
- *Streptococcus mutans* UA159

**Meios de cultura****LURIA BERTANI (LB)**

Triptona 10,0 g, Extrato de Levedura 5,0 g, Cloreto de Sódio 5,0 g, pH final de  $7,0 \pm 0,2$

**BRAIN HEART INFUSION (BHI)**

Cérebro-coração, infusão de (sólidos) 8,0 g, Hidrolisado péptico de tecido animal 5,0g, Hidrolisado pancreático de caseína 16,0 g, Cloreto de Sódio 5,0g, Glucose 2,0g, Fosfato dissódico de hidrogénio 2,5g, Ágar 13,5g, pH  $7,4 \pm 0,2$  Ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios do desempenho.

**TRYPTICASE SOY BROTH (TSB)**

Digesto Enzimático de Caseína 17,0g Digesto Papaico de Soja 3,0g Extrato de Levedura 6,0g Dextrose 2,5g Cloreto de Sódio 5,0g Fosfato de hidrogênio dibásico 2,5g Ágar 12g pH  $7,3 \pm 0,2$  a 25°C.

**HEPES (Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico)**

Agente tamponante ou buffer, largamente utilizado em cultura celular, pois mantém o pH fisiológico dos cultivos in vitro.

**Antibióticos**

- Ampicilina 100 µg/mL, Dissolvida em água MilliQ e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- Eritromicina 200µg/ mL

**Soluções para miniprep e midiprep****Solução I**

- Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM
- EDTA (pH 8,0) 10 mM

**Solução II**

- NaOH 0,2 M
- SDS 1% (p/v)
- Solução preparada no momento do uso.

**Solução III**

- Acetato de sódio 3M
- Ácido acético 2M
- O pH foi ajustado para 5,0.

**KITS**

- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega): purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose e de produtos de PCR.
- Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen): purificação de plasmídeos em grande escala (adaptado).