

2.12.02 - Microbiologia / Microbiologia Aplicada

## CARACTERIZAÇÃO POR PCR, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ANÁLISE DA VIABILIDADE DO BIOFILME FORMADO POR *S. oralis* E *S. salivarius* SOB A AÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA

Paula R. M. Valente<sup>1</sup>, Gisele da S. Sarkis<sup>2</sup>, Daniel Saito<sup>3</sup>, Ana A. Macedo<sup>4</sup>, Fernando J. Mendes<sup>5</sup> e Cristiane P.B. Saito\*<sup>3</sup>

1. Aluna de Graduação da Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (ESA - UEA)
2. Aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - UEA
3. Docente da ESA - UEA (nível – doutorado); orientadora\*
4. Docente do Instituto Federal do Maranhão- IFMA, *Campus-Imperatriz* (nível – doutorado)
5. Docente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra (ESTeSC) / Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal (nível – doutorado)

### Resumo

Os biofilmes são compostos por microrganismos aderidos à uma superfície por uma matriz extracelular, e a N-acetilcisteína - NAC representa alternativa para o controle do biofilme bacteriano. **Objetivos:** Caracterizar, por amplificação do DNA, as espécies estreptocócicas *S. oralis* e *S. salivarius*, de forma a garantir a isenção de contaminação e rastreabilidade das cepas; avaliar a ultraestrutura dos biofilmes sob MEV formados pelos estreptococos, perante a ação da NAC em discos de hidroxiapatita - HA. **Metodologia:** Extração e quantificação do DNA bacteriano à partir de culturas de *S. oralis* e *S. salivarius*. A inibição do biofilme foi avaliada sob NAC em discos de HA embebidos em saliva sob diferentes concentrações e observadas sob MEV. **Resultados:** A amplificação foi eficiente e específica para as amostras de *S. oralis* e *S. salivarius*. A NAC em baixas concentrações favoreceu o crescimento bacteriano e NAC à 12,5 mg/mL inibiu a formação de biofilme para as espécies avaliadas.

**Palavras-chave:** estreptococos orais; hidroxiapatita; antimicrobianos

**Apoio financeiro:** FAPeAM

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UEA

### Introdução

Biofilmes constituem comunidades microbianas estruturadas e funcionais inseridas em uma matriz extracelular, composta principalmente de polissacarídeos ou substância polimérica extracelular (SPE), que conferem estabilidade, proteção e resistência aos agentes desinfetantes. Mais de 500 espécies bacterianas podem ser encontradas colonizando a cavidade oral, e uma fração considerável destas pode conviver em um microbioma, como o biofilme dentário<sup>1-3</sup>. Entre os estreptococos encontrados no biofilme oral estão *S. oralis* e *S. salivarius*; no entanto, a difícil identificação e diferenciação entre diferentes espécies de estreptococos orais, por meio de técnicas convencionais de caracterização e identificação bacteriana, torna necessária a sua caracterização através de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>4</sup>, a qual apresenta sensibilidade extraordinária superando muito a cultura. A análise dos ácidos nucleicos de espécies de microrganismos, por meio da PCR é reconhecida como instrumento potencial para a detecção e identificação taxonômica de alta resolução de cepas bacterianas. A NAC, um agente mucolítico, tem sido proposta como alternativa para o controle do biofilme bacteriano em diversas infecções humanas, pois perturba a estabilidade da matriz e expõe os microrganismos aos antimicrobianos<sup>5-6</sup>. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica-chave que fornece informações sobre a morfologia e composição do biofilme, onde células bacterianas permanecem envolvidas em um denso glicocálice e é um dos métodos disponíveis para a visualização de efeitos antibacterianos no desenvolvimento desta estrutura<sup>7-8</sup>.

**Objetivos:** Caracterizar, por meio de amplificação do DNA, através da PCR, genes das espécies estreptocócicas *S. oralis* e *S. salivarius*, as quais integram uma coleção de microrganismos orais do laboratório de microbiologia da ESA-UEA, de forma a garantir a isenção de contaminação das culturas, bem como a rastreabilidade das cepas; avaliar a ultraestrutura de biofilmes orais, sob MEV, formados pelos estreptococos orais *S. oralis* e *S. salivarius*, perante a ação da NAC em discos de hidroxiapatita (HA).

## Metodologia

Extração e quantificação do DNA bacteriano obtido à partir de culturas em meio líquido das cepas de *S. oralis* e *S. salivarius*, de acordo com as especificações e protocolos referentes ao kit de extração de DNA (*Pure Link™ Microbiome DNA Purification Kit*) e quantificação em gel de agarose a 2%. A reação em cadeia da polimerase foi conduzida em termociclador (*Applied Biosystems*), utilizando-se: 40-90 ng de DNA genômico, 0,02-0,3 U/ $\mu$ L de Platinum™ Taq DNA polimerase Brasil (*Thermo Fisher Scientific*), 0,2-0,5  $\mu$ M de oligonucleotídeos, 1,5-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95-98°C por 30 segundos, 53-66°C por 30 segundos, 70-72°C por 40 segundos - 1 minuto, 72°C por 5 minutos e armazenamento à 4°C. A detecção ocorreu por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR® Safe stain (*Thermo Fisher Scientific*), submetido à 70V por 2 horas e documentado em transiluminador UV (302-312nm).

As espécies bacterianas *S. oralis* e *S. salivarius* foram obtidas em parceria com o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, as quais foram inoculadas em 3 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) em tubos de ensaio e armazenadas em estufa bacteriológica sob temperatura de 37°C durante 48 h, em jarra de anaerobiose. Após este período, os inóculos foram transferidos para microplacas de 96 poços, realizadas as diluições seriadas e os ajustes da turbidez para obtenção das concentrações bacterianas finais de 1x10<sup>6</sup> UFC/mL. A atividade de inibição do biofilme foi avaliada sob a ação da NAC, no intervalo de concentração entre 0,78 a 25 mg/mL por meio de ensaio colorimétrico e uso de protocolo modificado<sup>9</sup>.

Para os ensaios de formação de biofilme, através de protocolo utilizado por Shelburne e colaboradores<sup>10</sup> com modificações, os discos de HA foram embebidos em saliva clarificada e distribuídos em microplacas de 24 poços com os inóculos bacterianos para cada espécie de *S. oralis* e *S. salivarius*, juntamente aos meios adequados para obtenção de biofilmes durante três semanas, utilizando-se ensaios com a NAC em diferentes concentrações (12,5 mg/mL e 6,25 mg/mL); solução salina estéril e hidróxido de cálcio saturado como substitutos da NAC e como controles dos ensaios com os discos de HA. A ultraestrutura dos biofilmes sobre os discos foi avaliada por meio de técnicas de: fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, lavagem com tampão fosfato de potássio e pós-fixação com OsO<sub>4</sub> a 1% em tampão cacodilato 0,1 M. Após ciclos de desidratação sob sucessivas e crescentes concentrações de álcool etílico, os discos foram alocados na cesta para a secagem através de secador de ponto crítico automático Leica EM CPD300, revestidas em ouro (metalizador de alto vácuo Leica EM ACE600) e observadas sob microscopia eletrônica de varredura (aparelho - JSM-IT500HR JEOL).

## Resultados e Discussão

A extração de DNA produziu amostras purificadas, livres de resíduos da reação e em quantidade suficiente para as reações sequenciais de amplificação. A amplificação, por sua vez, foi eficiente e específica para as amostras que correspondem às espécies *S. oralis* e *S. salivarius*. *S. oralis* pertence ao grupo mitis, que são patógenos oportunistas e frequentemente encontrados em casos de endocardite bacteriana<sup>11</sup>. O gene que codifica a enzima glicose-3-fosfato, 1-deidrogenase (GDH) é relativamente conservado entre as espécies, apresentando uma região variável e permitindo o desenho de oligonucleotídeos espécie-específicos. Estes oligonucleotídeos foram utilizados, neste trabalho, visando amplificação da espécie *S. oralis*<sup>12</sup>. O gene que codifica a enzima glicosiltransferase (GTF), a qual usa a sacarose como substrato para a síntese de polissacarídeos extra-celulares, está presente na maioria dos estreptococos orais e apresenta uma região não conservada, que foi utilizada na confecção dos oligonucleotídeos para a espécie *S. salivarius*. A GTF de *S. oralis*, um dos primeiros estreptococos colonizadores orais, desempenha um papel importante na adesão de *S. mutans* o qual atua principalmente no desenvolvimento da cárie dentária. As sequências de oligonucleotídeos GTF que detectaram, por PCR, a espécie do grupo salivarius, foram descritas, primeiramente, em 2004 à partir de amostras de saliva<sup>4</sup> e estas sequências foram usadas no presente estudo. Ambos os pares de oligonucleotídeos demonstraram alta especificidade para as amostras analisadas, tendo em vista que as mesmas sequências não amplificaram espécies analisadas em triplicata de: *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. mitis*, todas extraídas por um mesmo operador. O tamanho do produto amplificado para cada espécie estava de acordo com o produto esperado e além da amplificação, foi feita a coloração de Gram para ambas as espécies, que apresentaram morfologia de cocos enfileirados em cadeia, característica de estreptococos.

O inóculo bacteriano foi padronizado para análise sob espectrofotometria, densidade óptica - 630 nm e foram obtidas as concentrações bacterianas finais de  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, as quais correspondem ao tubo nº. 0,5 da escala MacFarland. Nos ensaios colorimétricos prévios, a espécie *S. oralis* demonstrou suscetibilidade à ação da NAC nas concentrações: 0,78 mg/mL - 25 mg/mL e, sob a concentração 12,5 mg/mL, houve inibição da formação do biofilme para espécies de *S. oralis* e *S. salivarius*. Para as análises sob MEV, 15.000X de magnificação, foram propostas somente as concentrações de 6,25 e 12,5 mg/mL para NAC, considerando a discrepância dos resultados obtidos para estas concentrações no ensaio colorimétrico e o princípio do menor volume possível do agente usado no tratamento, à partir do qual se obtém algum efeito antibiofilme ou inibição a formação da SPE, preservando a integridade do hospedeiro. Tais concentrações também foram utilizadas por Moon e colaboradores<sup>6</sup>, que observaram inibição da formação de biofilme monoespécie sobre discos de HA, sob a concentração de NAC igual a 6,25 mg/mL. Os estudos demonstraram que NAC em baixas concentrações pode favorecer o crescimento bacteriano em conformidade com Yin e colaboradores<sup>13</sup>, que relataram que a combinação entre NAC e soro sanguíneo favoreceu a formação de biofilme por 7 diferentes cepas bacterianas. NAC a 12,5 mg/mL inibiu a formação de biofilme para as duas espécies, enquanto *S. oralis* demonstrou ser suscetível a NAC sob todas as concentrações avaliadas. Rasmussen e colaboradores<sup>5</sup> observaram efeito dose-dependente da NAC no acúmulo da biomassa e também no componente celular, quantificado por ensaio de vida e morte, associado ao biofilme, no entanto, não houve um decréscimo acentuado de células aderidas mediante aumento na concentração de NAC. Foi observado em biofilmes de *S. salivarius* e *S. oralis*, a prevalência de bastonetes, nas concentrações de NAC a 12,5 mg/mL e 6,25 mg/mL, respectivamente, enquanto foi evidente a morfologia em cocos para ambas as espécies observadas em meio contendo solução salina e em solução de NAC à 6,25 mg/mL para a espécie *S. salivarius*. Bactérias do grupo oralis são geneticamente competentes e capazes de assumir o DNA extracelular, especialmente na placa dentária, na qual as bactérias estão em proximidade de contato. Conseqüentemente, não é incomum a considerável heterogeneidade genética e fenotípica desta espécie<sup>14</sup>. Também foi relatado o aumento na expressão de muitos genes em espécies *S. aureus* e *P. aeruginosa* associadas ao biofilme, em função da exposição à NAC e soro sanguíneo, por meio de mecanismos ainda não totalmente compreendidos<sup>15</sup>, bem como a alta prevalência de morfologia filamentosa em biofilmes multiespécie<sup>5</sup>.

Ding e colaboradores<sup>15</sup> estabeleceram métodos que pudessem combater a formação de biofilmes orais sem comprometer o esmalte dentário, associando nanoprata e NAC 20% ao cimento ortodôntico para avaliar a atividade antibiofilme frente a *S. mutans*. A associação reduziu consideravelmente a atividade metabólica do biofilme, a produção de ácido láctico, bem como as UFC da colônia. Feng e colaboradores<sup>16</sup> obtiveram efeito bactericida sinérgico quando NAC 4,0 mg/mL esteve associada a tigeclina 0,5 µg/mL sobre biofilmes pré-formados de 72 h e NAC a 4,0 mg/mL, isoladamente, resultou em uma distribuição escassa de bactérias e preveniu a formação de biofilme.

## Conclusões

Os resultados apontam que a PCR é um método eficiente e robusto para a análise de espécies de estreptococos *S. salivarius* e *S. oralis* e pode ser usado para o rastreamento e identificação destas cepas bacterianas, em especial *S. oralis*, a qual está associada a endocardites e/ou infecções orais, evitando-se o sequenciamento de DNA.

A redução causada na matriz extracelular pela NAC pode ser uma vantagem potencial, uma vez que a estrutura do biofilme torna-se mais fraca, e as células presentes no biofilme podem se tornar mais suscetíveis ao sistema imune e a ação de outros agentes antimicrobianos, indicando este agente como nova opção terapêutica contra as infecções causadas por biofilme de estreptococos. Como a NAC apresenta mais de um possível mecanismo de ação contra biofilmes, novos estudos são necessários para avaliar se a redução na formação desses biofilmes é devida a alterações na quantidade e composição dos polissacarídeos extracelulares produzidos, que constitui o seu principal mecanismo de ação, ou devido à inibição do crescimento bacteriano conferido por suas propriedades antimicrobianas.

## Referências bibliográficas

1. Tran PL, Luth K, Wang J, Ray C, de Souza A, Mehta D, et al. Efficacy of a silver colloidal gel against selected oral bacteria in vitro. *F1000Research*. 2019 Mar 7;8:267.
2. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin Med*. 2019 Mar 20;14(1):11.
3. Souza JCM, Mota RRC, Sordi MB, Passoni BB, Benfatti CAM, Magini RS. Biofilm Formation on Different Materials Used in Oral Rehabilitation. *Braz Dent J*. 2016 Apr;27:141–7.
4. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using GTF genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004 Mar;48(3):195–9.
5. Rasmussen K, Nikrad J, Reilly C, Li Y, Jones RS. *N*-Acetyl- L -cysteine effects on multi-species oral biofilm formation and bacterial ecology. *Lett Appl Microbiol*. 2016 Jan;62(1):30–8.
6. Moon J-H, Choi Y-S, Lee H-W, Heo JS, Chang SW, Lee J-Y. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol*. 2016;54(4):322–9.
7. El Abed S, Ibsouda SK, Latrache H, Hamadi F. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. In: *Scanning electron microscopy*. Intechopen; 2012.
8. Eighmy TT, Maratea D, Bishop P. Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components. *Appl Environ Microbiol*. 1983 Jul 1;45:1921–31.
9. Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, Cakmakci L, Könönen E, Uitto V-J. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe*. 2009 Aug;15(4):164–7.
10. Shelburne SA, Granville C, Tokuyama M, Sitkiewicz I, Patel P, Musser JM. Growth characteristics of and virulence factor production by group A *Streptococcus* during cultivation in human saliva. *Infect Immun*. 2005 Aug;73(8):4723–31.
11. Douglas CWI, Heath J, Hampton KK, Preston FEY. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol*. 1993 39(3):179–82.
12. Banas JA, Zhu M, Dawson DV, Cao H, Levy SM. PCR-Based Identification of Oral Streptococcal Species. *Int J Dent*. 2016 Sep 14;2016: e3465163.
13. Yin S, Jiang B, Huang G, Zhang Y, You B, Chen Y, et al. The Interaction of N-Acetylcysteine and Serum Transferrin Promotes Bacterial Biofilm Formation. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(4):1399–409.
14. Marsh PD, Lewis MAO, Rogers H, Williams DW, Wilson M. *Marsh and Martin's Oral Microbiology - E-Book*. Elsevier Health Sciences; 2016. 271 p.
15. Ding R, Qian Y, Chen M, Yi J, Zhao Z. The effect of N-acetylcysteine on the antibacterial capability and biocompatibility of nano silver-containing orthodontic cement. *Angle Orthod*. 2021 Jul;91(4):515–21.
16. Feng J, Liu B, Xu J, Wang Q, Huang L, Ou W, et al. In vitro effects of N-acetylcysteine alone and combined with tigecycline on planktonic cells and biofilms of *Acinetobacter baumannii*. *J Thorac Dis*. 2018 Jan;10(1):212–8.