

## **AVALIAÇÃO DO PAPEL DO TRANSPORTADOR DE POLIAMINAS PotD NA FORMAÇÃO DE BIOFILME *in vitro* POR *Streptococcus pneumoniae***

### ***EVALUATION OF THE ROLE OF POLIAMIN TRANSPORTER PotD IN THE FORMATION OF BIOFILM *in vitro* BY *Streptococcus pneumoniae****

VIEIRA, Brenda<sup>1</sup>; CONVERSO, Thiago<sup>2</sup>; DARRIEUX, Michelle<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>(Graduando do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco); <sup>2</sup>(Docente do Curso de Biomedicina); <sup>3</sup>(Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade São Francisco)

**[vieirasb@outlook.com](mailto:vieirasb@outlook.com)**

**RESUMO.** *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria de grande importância mundial, responsável por mais de um milhão de mortes anuais. Comumente adquirido nos primeiros anos de vida, o pneumococo coloniza o trato respiratório superior de forma assintomática, formando biofilmes que persistem por meses na nasofaringe. No entanto, sob condições que alteram o ambiente bacteriano, tais como infecções virais, os pneumococos podem escapar do biofilme e invadir outros nichos, causando diversas doenças de gravidade variável. O transportador de poliaminas PotD é um importante fator de virulência do pneumococo. A imunização de camundongos com PotD recombinante é capaz de reduzir a colonização subsequente com a bactéria, em um processo que envolve a produção de elevados níveis da citocina IL-17. Também foi sugerido que PotD está envolvida na formação de biofilmes por pneumococo. Dessa forma, considerando i) o papel protetor de PotD em limitar a colonização bacteriana e ii) seu possível envolvimento na formação de biofilme, o presente estudo tem como objetivo elucidar o papel de PotD e das poliaminas na formação de biofilme por pneumococo. Durante a primeira etapa do trabalho, foi comparada a formação de biofilmes em pneumococos selvagens e mutantes negativos para Pot, através de ensaios de formação de biofilme em microplaca. Em seguida, a formação de biofilmes foi avaliada na presença de poliaminas – produto transportado por PotD, em comparação com meio sem adição de poliaminas. A bactéria mutante apresentou inibição da formação de biofilme *in vitro* em relação à estirpe selvagem. De forma semelhante, observa-se um aumento da formação de biofilme pela bactéria selvagem após adição de putrescina e espermidina. Em conjunto, os dados sugerem que o transporte de poliaminas é um mecanismo importante para a formação de biofilmes por pneumococos., uma vez que a ausência do transportador limita a formação de biofilmes, enquanto a adição de poliaminas favorece este evento. Os resultados deste estudo poderão contribuir para determinar o mecanismo de formação de biofilme em pneumococos, bem como sua possível correlação com o processo de colonização.

**Palavras -chave:** *Streptococcus pneumoniae*, transportador de poliaminas, biofilme.

**ABSTRACT.** *Streptococcus pneumoniae* is a bacterium of great importance worldwide, responsible for more than one million annual deaths. Commonly acquired in the first years of life, the pneumococcus colonizes the upper respiratory tract asymptotically, forming biofilms that persist for months in the nasopharynx. However, under conditions that alter the bacterial environment, such as viral infections, pneumococci can escape biofilm and invade other niches, causing several diseases of varying severity. The polyamine transporter PotD is an important virulence factor of the pneumococcus. Immunization of mice with recombinant PotD is able to reduce subsequent colonization with the bacteria in a process that involves the production of high levels of cytokine IL-17. It has also been suggested that PotD is involved in the formation of pneumococcal biofilms. Thus, considering i) the protective role of PotD in limiting bacterial colonization and ii) its possible involvement in biofilm formation, the present study aims to elucidate the role of PotD and polyamines in biofilm formation by pneumococci. During the first stage of this study, the biofilm production was compared in wild pneumococci and pot-negative mutants, through an *in vitro* biofilm formation assay. The mutant bacteria showed inhibition of *in vitro* biofilm formation compared to the wild strain. Next, biofilm production was evaluated in presence of polyamines – molecules transported by PotD - in comparison with medium without the addition of polyamines. Supporting our previous data, an increase in biofilm formation by wild type bacteria is observed in presence of putrescin and spermidin, an effect that was not observed in the mutant. Taken together with the data suggest that poliamin transport is an important mechanism for biofilm formation by pneumococci, since the absence of the transporter limits biofilm formation, while the presence of exogen poliamins favors its development. This study may contribute to elucidate the mechanisms involved in biofilm formation by pneumococci, as well as its possible correlation with the colonization process.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, poliamine transporter, biofilm.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae*, popularmente conhecido como pneumococo, é uma bactéria Gram-positiva, podendo ser encapsulado ou não, e anaeróbio facultativo. Capaz de colonizar de forma comensal a nasofaringe e a orofaringe (HENRIQUES-NORMARK; NORMARK, 2010). Em hospedeiros susceptíveis, causa diversas doenças com gravidade variável. É o agente etiológico mais comum em pneumonia e também é o causador da meningite, otite média e bacteremia (ROSSI; FRANCO; RODRIGUES; ANDREAZZI, 2012; SMITH-VAUGHAN; BYUN; NADKARNI; JACQUES et al., 2006).

A incidência da colonização por pneumococo varia de acordo com a idade; a frequência de colonização nos adultos saudáveis é de 5 a 10% e em crianças saudáveis é maior, atingindo 20 a 40% (REGEV-YOCHAY; RAZ; DAGAN; PORAT et al., 2004) sendo este valor potencializado quando frequentadas creches (40 a 70%) (GRAY; CONVERSE; DILLON, 1980). Além disso, crianças, idosos, pacientes imunocomprometidos e os que pertencem a outros grupos de risco (fumantes, asplênicos) apresentam maior susceptibilidade à infecção pneumocócica (Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 1997; WHITNEY; SCHAFFNER; BUTLER, 2001). Apesar da colonização na nasofaringe por pneumococos ser mais frequente do que a

infecção pneumocócica, vale ressaltar que o que determina se o pneumococo irá permanecer confinado à nasofaringe ou causar infecção é a susceptibilidade do hospedeiro colonizado e a virulência da cepa (KELLER; ROBINSON; MCDANIEL, 2016).

*S. pneumoniae* é responsável pela morte de mais de um milhão de pessoas por ano. As taxas de mortalidade estão relacionadas à bacteremia e à meningite, sendo mais elevadas nos extremos de idade. Em idosos, a mortalidade provocada por bacteremia chega a atingir 60% e por meningite, 80%. (ORIHUELA; TUOMANEN, 2006).

Atualmente existem vacinas pneumocócicas que tem como alvo o pneumococo encapsulado, que está associado às doenças mais invasivas; no entanto, os pneumococos não encapsulados, conhecidos como NESPs (do inglês *non-encapsulated pneumococci*) ainda mantém as taxas de infecção elevadas mesmo com a implementação das vacinas. Isto se deve à ineficácia da vacina contra esse grupo de bactérias, que se tornaram mais prevalentes graças à pressão seletiva contra os pneumococos capsulados. Também se observa alterações na frequência e prevalência de sorotipos capsulares; a redução na colonização por sorotipos vacinais leva a um aumento na infecção causada por sorotipos não vacinais (HICKS; HARRISON; FLANNERY; HADLER et al., 2007).

Em conjunto, os dados epidemiológicos apontam a necessidade de se investigar estratégias vacinais alternativas, capazes de promover proteção contra uma ampla gama de pneumococos, independente do sorotipo.

## 1.2 Papel do biofilme nas infecções por pneumococo

Na nasofaringe, os pneumococos organizam-se em biofilmes – comunidades altamente estruturadas que apresentam elevada resistência a agentes antimicrobianos, quando comparadas às células plancônicas (que não estão organizadas em biofilme). Sob a forma de biofilme, o pneumococo exibe baixa capacidade invasiva, conferindo um ambiente favorável para a multiplicação bacteriana e maior troca de material genético. Biofilmes também foram encontrados em superfícies mucosas durante infecção do ouvido médio, sinusite e pneumonia (CHAO; MARKS; PETTIGREW; HAKANSSON, 2014; SHAK; VIDAL; KLUGMAN, 2013). No entanto, apesar da forma em biofilme apresentar baixa capacidade invasiva foi demonstrado que o biofilme de *S. pneumoniae* pode inibir a produção de biofilme de espécies competidoras, como *S. aureus in vivo* (REDDINGER; LUKE-MARSHALL; SAUBERAN; HAKANSSON et al., 2018).

Em pneumococos, os biofilmes atuam como reservatório de microrganismos. Bactérias sob a forma de biofilmes – como ocorre durante a colonização – apresentam virulência reduzida, porém são fontes de bactérias patogênicas que se libertam do biofilme na presença de sinais do ambiente e se disseminam para diferentes locais (MARKS; REDDINGER; HAKANSSON, 2012). Estes sinais incluem: disponibilidade de nutrientes, variações na temperatura e presença de ATP extracelular (CHAO; MARKS; PETTIGREW; HAKANSSON, 2014); podendo ainda ser consequência de uma infecção pelo vírus influenza em indivíduos já colonizados por pneumococos.

O efeito sinérgico das infecções virais sobre a patogênese de pneumococos já foi observado em diferentes estudos (CHERTOW; MEMOLI, 2013; PETTIGREW; GENT; PYLES; MILLER et al., 2011); os vírus atuam promovendo a exposição de receptores nas células epiteliais, aumento da temperatura (febre), alteração na disponibilidade de nutrientes (glicose), produção de ATP extracitoplasmático, noradrenalina e citocinas pró-inflamatórias. Estes sinais levam a uma alteração no padrão de transcrição gênica no pneumococo,

promovendo a liberação de bactérias patogênicas (CHAO; MARKS; PETTIGREW; HAKANSSON, 2014). Como consequência, ocorre um aumento na multiplicação bacteriana e a dissociação do tecido nasofaríngeo (DIAVATOPOULOS; SHORT; PRICE; WILKSCH et al., 2010; MCCULLERS, 2014).

Além de atuar como reservatório de microrganismos com potencial patogênico, foi sugerido que o biofilme in vivo é um mecanismo de proteção contra a formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*). NETs são capazes de ligar e matar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de alguns tipos de leveduras patogênicas. Nas infecções pneumocócicas, embora seja possível observar a formação de NETs e sua ligação às bactérias, sua ação bactericida é reduzida (URBAN; LOURIDO; ZYCHLINSKY, 2006).

### 1.3 Transportador de poliaminas PotD

Diversos fatores bacterianos contribuem com a capacidade de colonização do pneumococo. Dentre esses fatores, destaca-se a proteína transportadora de poliaminas, PotD (FLEMMING; WINGENDER; SZEWZYK; STEINBERG et al., 2016; PIPKINS; BRADSHAW; KELLER; SWIATLO et al., 2017). Entende-se que para o funcionamento das células as poliaminas são moléculas imprescindíveis, por desempenhar um papel importante no crescimento celular, na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (SHAW, SWIATLO, 2006). Entre os tipos de poliaminas encontra-se: putrescina, espermidina, espermina e cadaverina.

Estas moléculas estão ligadas a diversos processos fisiológicos com forte interação com os ácidos nucleicos, modulando a função do RNA, do DNA e das trifosfatases nucleotídicas; síntese proteica e de substâncias relacionadas (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000). A maior parte das bactérias é capaz de sintetizar naturalmente, mas principalmente, transportar moléculas de poliaminas do meio extracelular para o meio intracelular utilizando um conjunto de proteínas de membrana. Em *S. pneumoniae*, o transporte de poliaminas é realizado pelo operon *potABCD* (complexo de transportadores de poliaminas), um conjunto de proteínas expressas virtualmente todas as cepas de *S. pneumoniae* (IGARASHI; ITO; KASHIWAGI, 2001).

Estudos fundamentados no alinhamento com proteínas similares, de outras bactérias, propõem a função de cada proteína do complexo PotABCD. A proteína PotA confere a função de fornecer energia ao complexo pelo fato de possuir um sítio de ligação para moléculas de ATP. As proteínas PotB e C tem características de proteínas transmembranas conferindo a função de formar canais de passagem das poliaminas. E por fim a proteína PotD (proteína a ser estudada neste trabalho), em específico a de pneumococo, possui um peptídeo sinal característico de Gram-positivos, sugerindo uma localização na superfície da membrana. Além disso, PotD possui sítios de ligação para espermidina e putrescina, sugerindo assim, que a PotD é responsável por capturar essas poliaminas do meio extracelular (SHAH; NANDURI; SWIATLO; MA et al., 2011).

Considerando a sua localização na membrana, a PotD vem sendo estudada como possível candidato vacinal contra o pneumococo em diferentes modelos de infecção. Camundongos imunizados com PotD apresentaram proteção contra a sepse por pneumococos virulentos (SHAH; SWIATLO, 2006). Além disso, foi mostrado que a imunização intranasal de camundongos com rPotD reduz a colonização da nasofaringe por pneumococo (MIN; ZHANG; WANG; GONG et al., 2012; SHAH; BRILES; KING; HALE et al., 2009). Os camundongos imunizados com rPotD se mostraram aptos a reconhecer o estímulo com a

proteína e responder produzindo óxido nítrico (CONVERSO; GOULART; RODRIGUEZ; DARRIEUX et al., 2017b), sugerindo que a imunização foi capaz de gerar memória nessas células (BOGDAN, 2001; BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000).

Além da imunização intranasal, foi observado que a imunização subcutânea dos camundongos com PotD é capaz de reduzir a colonização por pneumococo, ou seja, imunizações com PotD recombinante, demonstraram sua capacidade protetora contra a colonização nasal em camundongos (CONVERSO; GOULART; RODRIGUEZ; DARRIEUX et al., 2017b). Os mecanismos de proteção e fagocitose bacteriana, também foram investigados (CONVERSO; GOULART; RODRIGUEZ; DARRIEUX et al., 2017b).

Considerando a capacidade de PotD em reduzir a colonização da nasofaringe, este trabalho tem como finalidade investigar a relação do transportador de poliaminas PotD na formação de biofilme por *Streptococcus pneumoniae* em pneumococos selvagens e mutantes que não expressam o operon *potABCD*, bem como a sua formação de biofilme na presença das poliaminas.

## **METODOLOGIA**

### **2.1 Bactérias utilizadas no estudo**

Neste trabalho foram utilizadas a cepa de *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 – um isolado bacteriano encapsulado virulento de sorotipo 4, e seu mutante isogênico  $\Delta$ potABCD cujos genes *potA*, *potB*, *potC* e *potD* (correspondente ao operon *pot* inteiro) foram deletados. A cepa mutante foi construída por substituição alélica dos genes pertencentes ao operon *potABCD* por um cassete de resistência à canamicina, flanqueado pelas regiões a montante e a jusante do operon. Esta cepa foi doada pelo Dr. Anders Håkansson da Universidade de Lund, em Malmö, Suécia.

### **2.2 Condições de armazenamento**

Inicialmente as cepas selvagem e mutante, foram cultivadas até D.O 0,4 - 0,5 em meio THY. Em seguida, os estoques foram centrifugados e ressuspensos em 10% do volume final em meio THY com 20% de glicerol e armazenadas em freezer -80°C.

### **2.3 Cultivo em caldo para ensaio de biofilme**

Em uma placa de ágar sangue foram plaqueados 30 µL dos estoques permanentes e cultivados em anaerobiose a 37°C, overnight. Após este período, com o auxílio de um swab estéril, o cultivo foi coletado da placa e transferido para 8 mL de meio Trypticase Soy Broth (TSB). As amostras foram cultivadas em estufa a 37°C, até uma D.O.<sub>600nm</sub> entre 0,4-0,5.

### **2.4 Comparação da produção de biofilme in vitro por pneumococos selvagens e mutantes negativos para Pot.**

A formação de biofilme pelas cepas selvagem e mutante de *S. pneumoniae* foi quantificada por meio de um ensaio de adesão em microplaca de 24 poços, utilizando protocolo adaptado de (PIPKINS; BRADSHAW; KELLER; SWIATLO et al., 2017). Inicialmente as cepas selvagem e mutante foram cultivadas até uma D.O.<sub>600nm</sub> de 0,3 e transferidas para placas de 24 poços de

fundo chato. Para cada poço, foram adicionados  $10^5$  UFCs de bactérias em 1 ml de meio TSB, contendo 8 unidades/ml de catalase e soro equino a 10%. As amostras foram inoculadas em decaplicatas e incubadas a 37 °C, por 24 horas em anaerobiose. Após as incubações, o meio de cultura foi removido com micropipeta de 1000 µl e descartado em solução contendo água e hipoclorito. Os poços foram enxaguados com PBS 1x, e secos em temperatura ambiente. As células aderidas foram coradas com cristal violeta a 0,1% em água destilada, por 30 minutos. Em seguida, o corante foi descartado e as células foram lavadas novamente com PBS 1x por 3 vezes. O cristal violeta que aderiu às bactérias foi solubilizado em 1 ml de etanol 95% incubado entre 23-27°C durante 15 min em agitação de 80 rpm. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (Glomax) no comprimento de onda de 600 nm.

## **2.5 Comparação da produção de biofilme in vitro por pneumococos selvagens e mutantes negativos para Pot com adição de poliaminas exógenas.**

Para este ensaio, foi utilizado um protocolo adaptado de um estudo que avaliou o papel da espermidina na formação de biofilme em *Vibrio cholerae* (MCGINNIS; PARKER; WALTER; RUTKOVSKY et al., 2009).

Primeiramente as cepas selvagem e mutante foram cultivadas até uma D.O.<sub>600nm</sub> de 0,3-0,4. Neste momento, essas culturas foram inoculadas em uma placa de 24 poços de fundo chato, com  $10^5$  CFU de bactérias em 1 ml de meio TSB, contendo 8 unidades/ml de catalase, 10% de soro equino às quais foi adicionado putrescina ou espermidina nas concentrações de 2 mM; 1 mM; 0,5 mM e 0,25mM. As amostras foram cultivadas em decaplicata, sendo 3 poços para cada concentração de poliamina. Estas culturas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas em anaerobiose. Após as incubações, o meio de cultura foi removido com micropipeta de 1000 µl e descartado em solução contendo água e hipoclorito; os poços foram enxaguados com tampão fosfato-salino, foi aguardada a secagem da placa e as células aderidas foram coradas com cristal violeta a 0,1% por 30 minutos. Em seguida, o corante foi descartado, as células foram lavadas novamente com o tampão fosfato-salino, por 3 vezes a fim de garantir a retirada de qualquer resquício de cristal violeta garantindo somente a coloração das células aderidas. O cristal violeta que aderiu às bactérias foi solubilizado em 1 ml de etanol 95% e levado a agitação por 15 min em 80 rpm. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (Glomax) no comprimento de onda de 600 nm.

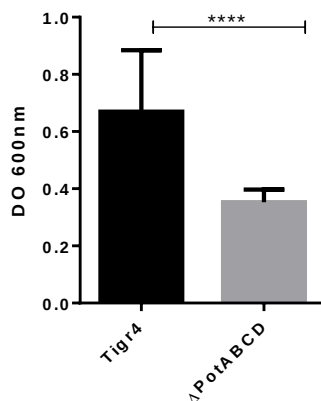
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Ensaio de biofilme por adesão em placa de 24 poços e ensaios de biofilme por adesão com poliaminas exógenas.**

A formação de biofilmes in vitro foi analisada através de um ensaio de cultivo bacteriano em placas de poliestireno de 24 poços, seguida pela coloração das células aderidas ao plástico (representando os biofilmes microbianos) com cristal violeta. Foram comparadas a bactéria selvagem e o mutante negativo para potABCD. A Figura 1 mostra os resultados desta análise. É possível observar uma diferença no crescimento e formação do biofilme, entre o pneumococo selvagem TIGR4 e a cepa mutante ΔpotABCD; o mutante apresentou menor formação de biofilme em comparação com a estirpe selvagem. Este resultado sugere que a bactéria mutante apresenta capacidade reduzida de formar biofilmes em superfícies abióticas, em comparação

com o pneumococo selvagem. Os dados da Figura 1 reforçam a hipótese deste estudo, de que a ausência do operon *potABCD* afeta a formação de biofilme, inibindo esse importante processo.

#### Ensaio de adesão de Biofilme *in vitro*

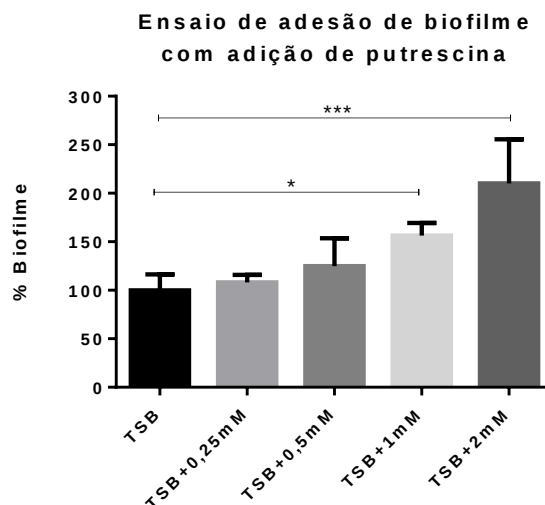


**Figura 1** – Ensaio de formação de biofilme por *S. pneumoniae* *in vitro*. A formação de biofilme foi avaliada após 24h de cultivo em microplaca contendo meio TSB suplementado com 8 unidades/ml de catalase e 10% de soro equino. A absorbância das amostras coradas com cristal violeta foi determinada em comprimento de onda de 600 nm, após coloração das bactérias aderidas ao plástico. Os resultados expressos são representativos de um experimento realizado em triplicata. \*\*\*\*p < 0.001 analisado por teste t de Student.

Este resultado está de acordo com o estudo realizado por PIPIKINS e colaboradores (2017), onde se demonstrou que, em uma cepa de pneumococo produtora de cápsula polissacarídica (como a TIGR4 do presente estudo), a ausência do operon *potABCD* levou a uma diminuição na formação de biofilme quando comparada com a bactéria selvagem. Interessante destacar que, naquele estudo, o resultado obtido para pneumococos sem cápsula foi inverso: as bactérias mutantes apresentaram maior formação de biofilmes em comparação com a cepa selvagem não-encapsulada. Este resultado sugere que a cápsula afeta a formação de biofilmes em pneumococo, o que pode justificar o aumento recente nas infecções de mucosa por pneumococos não encapsulados, mas não na doença invasiva.

Em um trabalho utilizando *Escherichia coli* como modelo de estudo, observou-se que a super expressão da proteína PotD foi capaz de estimular a transição das células planctônicas para o fenótipo de biofilme (ZHANG; ZHANG; LIU; LIU, 2013). Este dado reforça o papel das poliaminas na formação de biofilmes, e sugere que o mecanismo é conservado entre diferentes tipos de bactéria.

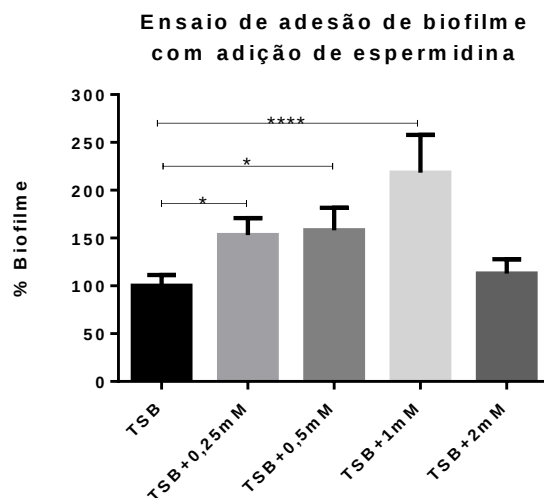
Em seguida, foi avaliada a formação de biofilmes por pneumococos na presença de putrescina exógena (Figura 2). A adição de putrescina exógena nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2mM provocou um aumento na formação de biofilme pela bactéria selvagem, em relação ao controle sem putrescina, demonstrando uma relação de dose dependência. Interessante notar que a adição de 2 mM de putrescina resultou em um efeito menor quando comparado às menores concentrações avaliadas.



TIGR 4

**Figura 2** - Formação de biofilme *in vitro* por *S. pneumoniae* com adição de putrescina exógena. A formação de biofilme foi avaliada após 24h de cultivo em microplaca com concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM de putrescina. A absorbância das amostras coradas com cristal violeta foi determinada em comprimento de onda de 600 nm e utilizada para calcular as porcentagens, considerando os controles sem putrescina como 100%. Os resultados expressos são representativos de experimentos realizados em triplicata. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste One-way ANOVA pós teste de Dunnet, onde \*\*\* $p < 0,001$  para One-way ANOVA e nas amostras com 2mM \*\*\* $p < 0,001$  e 1mM \* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.

Resultado semelhante foi obtido com a adição de espermidina exógena (Figura 3). É possível observar um aumento na formação de biofilme pela bactéria selvagem após adição de espermidina nas concentrações de 1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM em relação controle sem espermidina. Interessante notar que a adição de 2 mM de putrescina resultou em um efeito menor quando comparado às menores concentrações avaliadas. Ou seja, não foi suficiente para afetar a formação de biofilme pela bactéria, indicando que as poliaminas atuam de forma distinta na formação de biofilmes ou que o mecanismo de transporte de poliaminas favorece a entrada de putrescina na célula bacteriana em relação à espermidina.



TIGR 4

**Figura 3** - Formação de biofilme *in vitro* por *S. pneumoniae* com adição de espermidina exógena. A formação de biofilme foi avaliada após 24h de cultivo em microplaca com concentrações de 0,25mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM de espermidina. A absorbância das amostras coradas com cristal violeta foi determinada em comprimento de onda de 600 nm e utilizada para calcular as porcentagens, considerando os controles sem putrescina como 100%. Os resultados expressos são representativos de experimentos realizados em triplicata. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste One-way ANOVA pós teste de Dunnet, onde \*\*\*\* $p < 0,0001$  para One-way ANOVA e nas amostras com 1 mM \*\*\* $p < 0,05$ ; 0,5 mM e \* $p < 0,05$  0,25 mM em relação ao grupo controle.

As poliaminas podem ser encontradas na maioria das células, sendo a putrescina e espermidina mais presentes em células bacterianas. Além de serem sintetizadas pelas bactérias, elas também possuem ser transportadas a partir do meio externo por transportadores especializados, localizados na superfície da bactéria (SHAH; SWIATLO, 2008). Diversos estudos já relacionaram as poliaminas e/ou seus transportadores com a formação de biofilme (GOYTIA; DHULIPALA; SHAFER, 2013; MCGINNIS; PARKER; WALTER; RUTKOVSKY et al., 2009; PATEL; WORTHAM; LINES; FETHERSTON et al., 2006; RAMON-PEREZ; DIAZ-CEDILLO; CONTRERAS-RODRIGUEZ; BETANZOS-CABRERA et al., 2015).

No presente estudo, a adição das poliaminas putrescina e espermidina promoveu um aumento na formação de biofilme na bactéria selvagem. A espermidina favoreceu a formação de biofilme nas doses de 0,25 mM 0,5 mM e 1 mM sem diferença entre as duas concentrações menores, enquanto a putrescina foi efetiva nas doses de 1 e 2 mM, sendo o efeito máximo em 2 mM. Esses resultados também foram observados em outros trabalhos, por exemplo, em *Vibrio cholerae*, foi demonstrado que tanto a espermidina quanto a norspermidina conseguem ligar-se a uma proteína homóloga a PotD no espaço periplasmático, regulando de forma positiva a produção do biofilme; naquele estudo, houve um aumento na formação do biofilme nas concentrações maiores de espermidina, quando comparados com o meio de cultura sem adição de poliaminas (LEE; SPERANDIO; FRANTZ; LONGGOOD et al., 2009; MCGINNIS; PARKER; WALTER; RUTKOVSKY et al., 2009).

Em outro trabalho, cujo modelo de estudo foi *Yersinia pestis*, mutantes deficientes na síntese de putrescina foram construídos; como resultado, foi demonstrado que uma menor concentração de putrescina no interior da célula impactou fortemente na produção de biofilme. A bactéria incapaz de sintetizar a poliamina produziu uma quantidade muito inferior de biofilme

ao ser comparada com a bactéria selvagem (PATEL; WORTHAM; LINES; FETHERSTON et al., 2006). Similarmente, em *Pseudomonas aeruginosa*, o aumento na concentração de putrescina intracelular está ligado ao aumento na produção de biofilme (WILLIAMS; DU; CALCUTT; ABDOLRASULNIA et al., 2010).

Em nossos ensaios é visível que a adição de putrescina e espermidina exógena influencia diretamente na formação de biofilme *in vitro*, reforçando a ideia de que ausência do operon *potABCD* reduz a capacidade da bactéria de formar biofilme, diminuindo a oferta de poliaminas no interior das células bacterianas.

No entanto, diferente de bactérias como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, que possuem elevada capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas, nos pneumococos a formação de biofilmes *in vitro* é limitada e não está relacionada à doença invasiva (MARKS; PARAMESWARAN; HAKANSSON, 2012). Os biofilmes em pneumococos ocorrem principalmente durante colonização da nasofaringe, onde atuam como reservatórios de bactérias para focos infecciosos, e estão associados a infecções não invasivas que afetam as mucosas, como a otite (LOUGHRAN; ORIHUELA; TUOMANEN, 2019).

## CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliado o papel do transporte de poliaminas na formação de biofilmes *in vitro* por pneumococo. Mutantes de pneumococo negativos para o transportador de poliaminas apresentam capacidade reduzida de formação de biofilmes em superfícies abióticas, quando comparadas à bactéria selvagem.

Corroborando este resultado, a adição de poliaminas promoveu um aumento na formação de biofilmes pela cepa selvagem, mas não na bactéria mutante. Em conjunto, os dados sugerem que o transporte de poliaminas é importante para a formação de biofilmes por pneumococos.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## REFERÊNCIAS

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, 2, n. 10, p. 907-916, Oct 2001. Research Support, Non-U.S. Gov't. Review.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev**, 173, p. 17-26, Feb 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHAO, Y.; BERGENFELZ, C.; HAKANSSON, A. P. Growing and Characterizing Biofilms Formed by *Streptococcus pneumoniae*. **Methods Mol Biol**, 1968, p. 147-171, 2019.

CHAO, Y.; MARKS, L. R.; PETTIGREW, M. M.; HAKANSSON, A. P. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. **Front Cell Infect Microbiol**, 4, p. 194, 2014.



---

CHERTOW, D. S.; MEMOLI, M. J. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. **JAMA**, 309, n. 3, p. 275-282, Jan 16 2013.

CONVERSO, T. R.; GOULART, C.; RODRIGUEZ, D.; DARRIEUX, M. *et al.* Systemic immunization with rPotD reduces *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization in mice. **Vaccine**, 35, n. 1, p. 149-155, Jan 3 2017a.

CONVERSO, T. R.; GOULART, C.; RODRIGUEZ, D.; DARRIEUX, M. *et al.* Systemic immunization with rPotD reduces *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization in mice. **Vaccine**, 35, n. 1, p. 149-155, 2017/01/03/ 2017b.

DIAVATOPOULOS, D. A.; SHORT, K. R.; PRICE, J. T.; WILKSCH, J. J. *et al.* Influenza A virus facilitates *Streptococcus pneumoniae* transmission and disease. **FASEB J**, 24, n. 6, p. 1789-1798, Jun 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol**, 14, n. 9, p. 563-575, Aug 11 2016.

GOYTIA, M.; DHULIPALA, V. L.; SHAFER, W. M. Spermine impairs biofilm formation by *Neisseria gonorrhoeae*. **FEMS Microbiol Lett**, 343, n. 1, p. 64-69, Jun 2013.

GRAY, B. M.; CONVERSE, G. M., 3rd; DILLON, H. C., Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. **J Infect Dis**, 142, n. 6, p. 923-933, Dec 1980.

HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. **Exp Cell Res**, 316, n. 8, p. 1408-1414, May 1 2010.

HICKS, L. A.; HARRISON, L. H.; FLANNERY, B.; HADLER, J. L. *et al.* Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. **J Infect Dis**, 196, n. 9, p. 1346-1354, Nov 1 2007.

IGARASHI, K.; ITO, K.; KASHIWAGI, K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. **Res Microbiol**, 152, n. 3-4, p. 271-278, Apr-May 2001. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun**, 271, n. 3, p. 559-564, May 19 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't

---

## Review.

KELLER, L. E.; ROBINSON, D. A.; MCDANIEL, L. S. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. **MBio**, 7, n. 2, p. e01792, Mar 22 2016.

LEE, J.; SPERANDIO, V.; FRANTZ, D. E.; LONGGOOD, J. *et al.* An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **J Biol Chem**, 284, n. 15, p. 9899-9907, Apr 10 2009.

LOUGHRAN, A. J.; ORIHUELA, C. J.; TUOMANEN, E. I. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. **Microbiol Spectr**, 7, n. 2, Mar 2019.

MARKS, L. R.; PARAMESWARAN, G. I.; HAKANSSON, A. P. Pneumococcal interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization in vitro and in vivo. **Infect Immun**, 80, n. 8, p. 2744-2760, Aug 2012.

MARKS, L. R.; REDDINGER, R. M.; HAKANSSON, A. P. High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. **MBio**, 3, n. 5, 2012.

MCCULLERS, J. A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. **Nat Rev Microbiol**, 12, n. 4, p. 252-262, Apr 2014.

MCGINNIS, M. W.; PARKER, Z. M.; WALTER, N. E.; RUTKOVSKY, A. C. *et al.* Spermidine regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation via transport and signaling pathways. **FEMS Microbiol Lett**, 299, n. 2, p. 166-174, Oct 2009.

MIN, X.; ZHANG, X.; WANG, H.; GONG, Y. *et al.* Protection against pneumococcal infection elicited by immunization with glutamyl tRNA synthetase, polyamine transport protein D and sortase A. **Vaccine**, 30, n. 24, p. 3624-3633, May 21 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

ORIHUELA, C. J.; TUOMANEN, E. *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation. In: **Gram-Positive Pathogens, Second Edition**: American Society of Microbiology, 2006. p. 253-267.

PATEL, C. N.; WORTHAM, B. W.; LINES, J. L.; FETHERSTON, J. D. *et al.* Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. **J Bacteriol**, 188, n. 7, p. 2355-2363, Apr 2006.

PETTIGREW, M. M.; GENT, J. F.; PYLES, R. B.; MILLER, A. L. *et al.* Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. **J Clin Microbiol**, 49, n. 11, p. 3750-3755, Nov 2011.

PIPKINS, H. R.; BRADSHAW, J. L.; KELLER, L. E.; SWIATLO, E. *et al.* Polyamine transporter potABCD is required for virulence of encapsulated but not nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS One**, 12, n. 6, p. e0179159, 2017.

Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**, 46, n. RR-8, p. 1-24, Apr 4 1997.

RAMON-PEREZ, M. L.; DIAZ-CEDILLO, F.; CONTRERAS-RODRIGUEZ, A.; BETANZOS-CABRERA, G. *et al.* Different sensitivity levels to norspermidine on biofilm formation in clinical and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains. **Microb Pathog**, 79, p. 8-16, Feb 2015.

REDDINGER, R. M.; LUKE-MARSHALL, N. R.; SAUBERAN, S. L.; HAKANSSON, A. P. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* Modulates *Staphylococcus aureus* Biofilm Dispersion and the Transition from Colonization to Invasive Disease. **MBio**, 9, n. 1, Jan 9 2018.

REGEV-YOCHAY, G.; RAZ, M.; DAGAN, R.; PORAT, N. *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. **Clin Infect Dis**, 38, n. 5, p. 632-639, Mar 1 2004.

ROSSI, F.; FRANCO, M. R. G.; RODRIGUES, H. M. d. P.; ANDREAZZI, D. *Streptococcus pneumoniae*: sensibilidade a penicilina e moxifloxacina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 38, n. 1, p. 66-71, 2012-02 2012.

SANCHEZ, C. J.; KUMAR, N.; LIZCANO, A.; SHIVSHANKAR, P. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. **PLoS One**, 6, n. 12, p. e28738, 2011.

SHAH, P.; BRILES, D. E.; KING, J.; HALE, Y. *et al.* Mucosal immunization with polyamine transport protein D (PotD) protects mice against nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae*. **Exp Biol Med (Maywood)**, 234, n. 4, p. 403-409, Apr 2009.

SHAH, P.; NANDURI, B.; SWIATLO, E.; MA, Y. *et al.* Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. **Microbiology**, 157, n. Pt 2, p. 504-515, Feb 2011.

SHAH, P.; SWIATLO, E. Immunization with polyamine transport protein PotD protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 74, n. 10, p. 5888-5892, Oct 2006.



<http://ensaios.usf.edu.br>

---

SHAH, P.; SWIATLO, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. **Mol Microbiol**, 68, n. 1, p. 4-16, Apr 2008.

SHAK, J. R.; VIDAL, J. E.; KLUGMAN, K. P. Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. **Trends Microbiol**, 21, n. 3, p. 129-135, Mar 2013. Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't

Review.

SMITH-VAUGHAN, H.; BYUN, R.; NADKARNI, M.; JACQUES, N. A. *et al.* Measuring nasal bacterial load and its association with otitis media. **BMC Ear Nose Throat Disord**, 6, p. 10, May 10 2006.

URBAN, C. F.; LOURIDO, S.; ZYCHLINSKY, A. How do microbes evade neutrophil killing? **Cell Microbiol**, 8, n. 11, p. 1687-1696, Nov 2006.

WHITNEY, C. G.; SCHAFFNER, W.; BUTLER, J. C. Rethinking recommendations for use of pneumococcal vaccines in adults. **Clin Infect Dis**, 33, n. 5, p. 662-675, Sep 1 2001.

WILLIAMS, B. J.; DU, R. H.; CALCUTT, M. W.; ABDOLRASULNIA, R. *et al.* Discovery of an operon that participates in agmatine metabolism and regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, 76, n. 1, p. 104-119, Apr 2010.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.; LIU, J.; LIU, H. PotD protein stimulates biofilm formation by *Escherichia coli*. **Biotechnol Lett**, 35, n. 7, p. 1099-1106, Jul 2013.