

MARGARETH BULHMAN BALLINI

**ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Streptococcus*
mutans E COMPONENTES DA SALIVA NA
SUSCEPTIBILIDADE À CÁRIE EM CRIANÇAS**

BRAGANÇA PAULISTA-SP

2011

i

MARGARETH BULHMAN BALLINI

ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Streptococcus mutans* E COMPONENTES DA SALIVA NA SUSCEPTIBILIDADE À CÁRIE EM CRIANÇAS

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. MICHELLE DARRIEUX SAMPAIO BERTONCINI

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para obtenção do título de Mestre.

BRAGANÇA PAULISTA-SP

2011

ii

MARGARETH BULHMAN BALLINI

**ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Streptococcus*
mutans E COMPONENTES DA SALIVA NA
SUSCEPTIBILIDADE À CÁRIE EM CRIANÇAS**

Banca examinadora


Profa Dra Michelle Darreix Sampaio Bertoncini

Prof Dr Lucio Fabio Caldas Ferraz

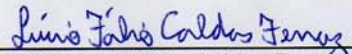
Profa Dra Cibele Aparecida Tararam

Bragança Paulista, 29 de novembro de 2011


BALLINI, Margareth Bulhman "ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E COMPONENTES DA SALIVA NA SUSCEPTIBILIDADE À CÁRIE EM CRIANÇAS"
Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e nove de novembro de 2011 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profª. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco



Profª. Dra. Cibele Aparecida Tararam
Universidade Federal de São Paulo

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha querida família,
especialmente, ao meu filho Bruno

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo.

Ao meu pai Haroldo, pela força e incentivo no início deste estudo. Que ele possa, agora em outro plano, receber este carinho.

À minha mãe Maria, pelo constante apoio e ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Lincoln e Haroldo, que colaboraram sempre, em todas as etapas deste trabalho.

Às cunhadas Rosana e Valdirene que sempre estiveram carinhosamente presentes.

Às sobrinhas Elisa, Alice e Lívia pela alegria constante, em todos os momentos.

À minha avó Francisca, oitenta e nove anos de pura força.

Ao meu querido filho Bruno pelo amor, paciência, tolerância e compreensão.

Às prestativas Leonilde, Janaína e D.Maria, que muito me ajudaram com o Bruno, para que eu pudesse estudar.

À minha outra família em Jaboticabal. Sempre presentes, apesar da distância.

À minha orientadora Michelle, pela competência, profissionalismo e ajuda em todo o decorrer do curso.

Ao colega Rodrigo, a quem muito devo, pelo valoroso trabalho em laboratório.

Às colegas Irina e Kamila, que apesar de breve, também colaboraram com as pesquisas.

Às crianças, pacientes que doaram saliva.

Ao Butantan, à USF e aos demais colegas de laboratório.

E, por último, mas não menos importante, agradeço aos animais que participaram da pesquisa.

Obrigada a todos!

Epígrafe

Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo
começo, mas qualquer um pode recomeçar
e fazer um novo fim.

Chico Xavier

RESUMO

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da cárie, tais como a dieta, fatores do hospedeiro – incluindo diversos componentes da saliva – e a presença de microrganismos acidogênicos na mucosa oral, particularmente *Streptococcus mutans*. Apesar da influência de *S. mutans* no desenvolvimento da cárie, esta bactéria apresenta elevada prevalência entre indivíduos saudáveis, sugerindo que variações genéticas deste patógeno podem resultar em maior ou menor potencial cariogênico. Com base nesta hipótese, o presente estudo teve por objetivo correlacionar certos fatores de virulência de *Streptococcus mutans* e componentes da saliva com a susceptibilidade à cárie em crianças. Amostras de saliva foram coletadas de 26 crianças, sendo 14 sem cárie e 12 com cárie (após avaliação clínica da cavidade oral) e avaliadas quanto à capacidade de aglutinar *S. mutans*. Os microrganismos foram isolados destas amostras de saliva, e analisados quanto à presença do gene para a mutacina IV e formação de biofilme *in vitro*. Em conjunto, os resultados sugerem que a capacidade adesiva de *S. mutans* e o potencial aglutinante da saliva correlacionaram-se com a presença de lesões cariosas nos voluntários. Devido à importância da formação de biofilme para o desenvolvimento da cárie, a proteína reguladora de biofilme A (BrpA) foi avaliada como possível candidata vacinal contra *S. mutans*. O gene *brpA* foi clonado e expresso em *E. coli*, e a proteína recombinante, produzida e utilizada na imunização de camundongos, onde se mostrou bastante imunogênica.

Palavras-chave: *S. mutans*, cárie, BrpA.

ABSTRACT

Many factors contribute to caries development in humans, such as diet, host factors – including different saliva components – and the presence of acidogenic bacteria in the oral mucosa, particularly *Streptococcus mutans*. Despite the influence of *S. mutans* on caries development, this bacterium is also prevalent among healthy individuals, suggesting the contribution of genetic variation on the cariogenic potential. Based on this hypothesis, the present work investigated the influence of *S. mutans* virulence factors and saliva components on caries susceptibility in children. Saliva of 26 children were collected, being 14 caries-free and 12 caries-active individuals (after clinical evaluation of the oral mucosa) and tested for the ability to agglutinate *S. mutans*. The bacteria were isolated from these samples and analysed for the presence of a gene coding for mutacin IV, as well as biofilm formation *in vitro*. Altogether, the results suggest that the adhesive properties of *S. mutans* and the agglutination capacity of the saliva samples correlated with the presence of caries lesions in the volunteers. Due to the importance of biofilm formation in caries development, the biofilm regulatory protein A (BrpA) was evaluated as a possible vaccine candidate against *S. mutans* infection. The *brpA* gene was cloned e expressed in *E. coli*, and the recombinant protein, used in the immunization of mice, inducing high antibody titers.

Key words: *S. mutans*, caries, BrpA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS: Absorbância

ADP: adenosina difosfato

AgDs: do inglês “agmatine deiminase system”

Amp: ampicilina

ATP: adenosina trifosfato

BHI: do inglês “Brain-heart infusion”

BSA: albumina bovina sérica

BrpA: Biofilm Regulatory Protein A

DO: densidade ótica

Dpr: do inglês “peroxide resistance protein D”

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

Fap 1: do inglês “Fimbriae associated adhesin 1”

FITC: do inglês “fluorescein isothiocyanate”

FTF: frutossiltransferase

Gbp: do inglês “glucan binding protein”

GTF: glicosiltransferase

HtrA: do inglês “High-temperature requirement A”

Ip: intraperitonal

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

IgA: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

LB: meio Luria-Bretani

Nox: NADH oxidase

OPD: di-hidrocloreto de *o*-fenilenediamina

ORF: do inglês “open Reading Frame”

Pac: do inglês “surface protein antigen”

PBS: solução salina tamponada

PCR: reação em cadeia de polimerase

PEC: polissacarídeos extracelulares

PIC: polissacarídeos intracelulares

ROS: espécies reativas de oxigênio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Smx: endonucleaseapurínica/apirimidinica de *S. mutans*

SOD: superóxido desmutase

SpaP: proteína associada à superfície de *S. mutans*

TCS: sistema de transdução de sinais de dois componentes

TE: tampão tris-EDTA

Tm: do inglês “Temperature of melting”

TSB: do inglês “Tropic Soy Broth”

WapA: do inglês “wall-associated protein A”

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Respostas ao questionário pessoalpágina 30

Tabela 02. Avaliação clínica da cavidade oral dos participantes do estudo.....página 31

Tabela 03. Amostras positivas para genes *brpA* e mutacina IV.....página 35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Esquema da Formação do Biofilme oral a partir da formação de glucanos pelas enzimas GTFs, de *S. mutans*.....página 08
- Figura 02.** Distribuição das amostras de saliva em crianças com e sem cárie nas escolas 1 e 2.....página 22
- Figura 03.** Parâmetros avaliados pelo questionário sobre hábitos diários dos indivíduos do estudo..... página 29
- Figura 04.** Cultivo em Agar Mitis Salivarius da saliva de crianças em idade escolar com ou sem cárie..... página 32
- Figura 05.** Coloração de Gram de um esfregaço de *Streptococcus mutans* isolado de saliva de criança em idade escolar e cultivado em meio BHI..... página 33
- Figura 06.** Formação de biofilme por *S. mutans* isolados de crianças com e sem cárie, em presença de sacarose..... página 34
- Figura 07.** Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene da mutacina IV a partir de isolados de *S. mutans*..... página 35
- Figura 08.** Avaliação do efeito aglutinante da saliva sobre *S. mutans*..... página 36
- Figura 09.** Eletroforese em gel de agarose do gene *brpA* amplificado por PCR..... página 37
- Figura 10.** Eletroforese em gel da agarose dos produtos da digestão enzimática de pGEM-T Easy-*brpA*..... página 38
- Figura 11.** Análise da proteína BrpA purificada de *E. coli* BL21DE3..... página 39
- Figura 12.** Análise da produção de IgG anti-BrpA em camundongos por ELISA.....página 40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	03
1.2 <i>S. mutans</i> e a formação de biofilmes.....	04
1.3 Fatores de virulência de <i>S. mutans</i>	10
1.3.1 Mutacinas.....	12
1.4 Vacinas contra <i>S. mutans</i>	14
1.5 <i>S. mutans</i> e BrpA.....	16
2. OBJETIVO.....	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	22
3.2 Coleta das amostras de saliva.....	22
3.3 Isolamento de <i>S. mutans</i> da saliva.....	23
3.4 Extração do DNA cromossomal de <i>S. mutans</i>	24
3.5 Análise da virulência de <i>S. mutans</i>	24
3.5.1 Amplificação do gene da Mutacina IV a partir dos isolados de <i>S. mutans</i>	24
3.5.2 Ensaio de aderência dependente de sacarose de <i>S. mutans</i>	25
3.6 Medida da capacidade aglutinante da saliva.....	25
3.7 Avaliação imunológica de BrpA.....	26
3.7.1 Clonagem do gene <i>brpA</i> em vetor de expressão em procariotos.....	26
3.7.2 Produção da proteína BrpA em <i>E. coli</i>	27
3.8 Imunização de camundongos.....	27
3.9 Análise da produção de anticorpos.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Análise dos questionários.....	29
4.2 Isolamento de <i>S. mutans</i> das amostras de saliva.....	31
4.3 Análise da formação de biofilme por <i>S. mutans</i>	33
4.4 Análise da presença do gene para mutacina IV em <i>S. mutans</i>	34

4.5 Avaliação do potencial aglutinante das amostras de saliva.....	36
4.6 Clonagem do gene <i>brpA</i> em vetor de expressão em procariotos.....	36
4.7 Produção da proteína BrpA.....	38
4.8 Avaliação da resposta imune humoral em camundongos imunizados com BrpA.....	39
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada um problema de saúde pública em escala global. Apresenta alta prevalência na maior parte das populações modernas, especialmente nos países em desenvolvimento (Freysleben *et al.*, 2000; Maltz & Silva, 2001), sendo responsável por enormes perdas econômicas. As lesões cáries em geral causam dor e desconforto, podendo levar à disfunção mastigatória, alterações na estética facial, além de ser causa indireta de outros problemas de saúde (Pinto, 1999). Na ausência de tratamento, pode levar à destruição total do dente (Freire *et al.*, 1999).

Em 2003, um levantamento nacional realizado pelo Ministério da Saúde mostrou que cerca de 13,5% dos adolescentes no país nunca haviam tido uma consulta odontológica. Esta proporção foi menor na região Sul (5,8%) e maior na região Nordeste (21,8%) (Projeto SB Brasil 2003). Este mesmo levantamento epidemiológico mostrou a porcentagem de dentes cariados em crianças de 12 anos: a região Norte foi a mais afetada, apresentando um índice de 75,52% de dentes cariados; a região Nordeste apresentou um índice de 71,47%, a região Centro-Oeste 52,22%, a região Sul 48,05%, e a região Sudeste 42,17%.

Estudos epidemiológicos mostram que a cárie é uma doença que acomete principalmente a faixa etária infanto-juvenil, a população de baixa renda, e as crianças com pais de menor escolaridade (Lacerda, 1999).

A cárie é uma doença multifatorial, relacionada a fatores do hospedeiro, questões como dieta e higiene bucal, e à presença de certos tipos de microrganismos produtores de ácido na cavidade oral.

O dente apresenta um comportamento dinâmico em relação ao meio bucal. Assim, mantendo um pH maior que 5,5 na cavidade bucal, o dente ganhará Ca (Cálcio) e P (Fósforo) do meio bucal, em um processo conhecido como remineralização do esmalte. Quando atinge um pH menor que 5,5 o esmalte perderá Ca^{++} e P^+ para o meio bucal, tentando atingir o equilíbrio. Esse fenômeno é chamado desmineralização. Assim, a cárie dental resultará do desequilíbrio entre estes fatores (Cury, 1999).

As bactérias produtoras de ácido são essenciais para o estabelecimento da cárie. Em princípio, qualquer bactéria da cavidade oral capaz de converter açúcares em ácidos apresenta potencial cariogênico. Aqui, destacam-se os *Streptococcus sobrinus* pertencentes ao grupo

Mutans e também os *Lactobacillus*. No entanto, *Streptococcus mutans* são particularmente eficazes neste processo graças à sua capacidade de sobreviver e de produzir biofilmes no meio ácido que originam (Flemming & Wingender, 2010). Além da cárie dental, *S. mutans* é freqüentemente um agente da endocardite, uma inflamação das válvulas cardíacas potencialmente fatal (Nakano *et al.*, 2009).

As crianças adquirem as bactérias orais logo após o nascimento, normalmente por contaminação das próprias mães (Emanuelsson *et al.*, 2000). Se os níveis de *S. mutans* da mãe forem elevados, a chance da criança tornar-se infectada aumenta (Köhler *et al.*, 1984; Caufield *et al.*, 1993, Emanuelsson *et al.*, 2000).

Apesar do *S. mutans* ser considerado o principal agente etiológico da cárie dental (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1986), a simples presença desta bactéria na cavidade oral nem sempre leva ao desenvolvimento da cárie; de fato, *S. mutans* pode ser encontrado não somente em populações com moderada ou alta prevalência de cárie (Beighhton *et al.*, 1987; Alaluwsua *et al.*, 1987), mas também em populações que não têm ou têm baixa experiência com cárie (Carlsson *et al.*, 1985; Matee *et al.*, 1993). Uma possível explicação para esta aparente discrepância é a contribuição de múltiplos fatores para o desenvolvimento da cárie. Fatores de virulência da bactéria, por exemplo, podem diferir entre populações com contrastante prevalência de cárie (Emilson *et al.*, 1987, Saarela *et al.*, 1996; Li & Caufield, 1998; Grönroos & Alaluwsua, 1998; Kamiya *et al.*, 2005). A dieta, em particular o consumo de carboidratos, também contribui para o estabelecimento da cárie. Alaluwsua e colaboradores (1996) verificaram que crianças com elevado consumo de sacarose apresentaram maior incidência de cárie quando comparadas às crianças que consumiam menos sacarose. Também foi observada uma maior variabilidade genotípica nas bactérias isoladas das crianças com cárie, indicando que o consumo elevado de sacarose poderia estar relacionado à maior diversidade de *S. mutans* na cavidade oral.

Fatores do hospedeiro também parecem influenciar na susceptibilidade à cárie. A saliva contém diversos componentes da imunidade inata, como as proteínas bactericidas lactoferrina e lisozima, e adquirida, como anticorpos IgA e IgG, que participam do controle da multiplicação bacteriana na cavidade oral. Em um estudo da correlação entre componentes antimicrobianos da saliva e desenvolvimento da cárie em humanos, foi verificado que a concentração de lactoferrina e IgG total na saliva é inversamente proporcional ao desenvolvimento de cáries (Kirstilä *et al.*, 1998). No entanto, naquele estudo, nenhum parâmetro isolado mostrou correlação forte o

suficiente para permitir o diagnóstico em relação a cáries futuras. Tais resultados sugerem que a combinação de fatores do hospedeiro e dos isolados de *S. mutans* presentes na cavidade oral compõem um perfil de susceptibilidade ao aparecimento de cáries.

A compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da cárie permitirá o desenvolvimento de novas abordagens de combate a esta doença.

1.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans são bactérias Gram-positivas, do grupo Viridans, com morfologia de cocos, catalase-negativas. Pertencem ao grupo de Estreptococos do tipo *Mutans*, que inclui outras espécies como *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus rattis*, *Streptococcus cricetti*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus downei* e *Streptococcus orisratti*. Dentre estes, *S. sobrinus* contribui com a progressão das cáries iniciadas por *S. mutans* (Köhler *et al.*, 2003). *S. mutans* pode ser isolado da orofaringe (podendo sobreviver em qualquer parte da cavidade oral), do sistema gastrointestinal e do sistema urinário. Além da cárie dentária, estão também associados à endocardite subaguda e a infecções intra-abdominais. Aderem com facilidade ao esmalte dentário e às válvulas cardíacas (Murray, 1998).

Streptococcus mutans são anaeróbios facultativos, capazes de metabolizar uma grande variedade de açúcares, incluindo glicose, lactose, sacarose, trealose, maltose, manitol, sorbitol, rafinose e melobiose (Coykendall, 1989). São bactérias ácido-lático-homo-fermentativas (Drucker & Melville, 1969). Quando o estoque de carboidrato é limitado, esta bactéria também produz acetato e etanol.

Os *S. mutans* também sintetizam polissacarídeos intra-celulares (PIC), que são metabolizados para a produção de ácidos na falta de carboidratos fermentáveis exógenos (Grönroos, 2000). Quando houver açúcares em excesso, o glicogênio será fonte de energia potencial em forma de polissacarídeo intracelular. Assim ocorre um aumento no reservatório intracelular de frutose 1,6 bifosfato e intermediários glicolíticos e inicia-se a síntese de polissacarídeos pela atuação da ADP-glicose fosforilase (Thylstrup & Fejerskov, 1995). Os PIC atuam drenando os intermediários glicolíticos da célula, protegendo contra metabólitos intermediários tóxicos (Iwaami *et al.*, 2001). Quando nenhum açúcar for suplementado pela dieta,

os PICs são utilizados como fonte de energia e os ácidos são secretados, em um mecanismo regulado pelos níveis exógenos de açúcar, onde nos baixos níveis a reserva intracelular aumenta, resultando na ativação de glicogênio fosforilase e consumo da reserva intracelular de polissacarídeos (Thylstrup & Fejerskov, 1995).

O seqüenciamento do genoma da cepa de *S. mutans* UAB159, da Universidade do Alabama, foi concluído em 2002 e revelou a presença de diversas vias não-oxidativas de metabolização de carboidratos e sistemas de transporte associados, entre as 1963 ORFs identificadas no estudo (Ajdic *et al.*, 2002). Também foram identificados diversos genes relacionados à virulência do organismo, como aqueles associados à produção de glucanos extracelulares, adesinas, proteases de tolerância ácida e hemolisinas putativas. Foi detectada ainda a presença de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de antibióticos da família da gramicidina e bacitracina.

A tolerância ácida representa um dos principais mecanismos de sobrevivência de *S. mutans*, e está intimamente relacionada à sua virulência. A considerável diminuição do pH foi observada na cavidade oral em poucos minutos após o consumo de glicose (Kleinberg, 2002). Isso implica que a bactéria é rapidamente acidogênica. A aciduridade do *S. mutans* está relacionada ao seu potencial cariogênico. Além de gerar e tolerar ácido, *S. mutans* consegue também tolerar a exposição a rápidos e contínuos ciclos de choques ácidos. *In vivo*, o pH pode variar da faixa neutra até valores entre 3.0 a 4.0 em menos de vinte minutos após a ingestão de carboidratos (Imfeld & Lutz, 1980; Yamada *et al.*, 1980; Mormann & Muhlemann, 1981; Shachtele & Hailander, 1984; Jensen & Wefel, 1989).

1.2 *S. mutans* e a formação de biofilmes

A cárie é uma doença que se desenvolve a partir da formação de um biofilme composto por bactérias cariogênicas, que são altamente eficientes na conversão de carboidratos em ácidos orgânicos que desmineralizam o esmalte do dente (Shen *et al.*, 2004). Biofilmes são comunidades formadas por um ou mais microrganismos aderidos a diferentes superfícies. São associados com uma variedade de infecções humanas e são resistentes a antibióticos e às respostas imunológicas (Cury, 1999; Fleming & Wingender, 2010).

A placa dentária, encontrada comumente sobre a superfície dos dentes, é um biofilme microbiano constituído por uma comunidade diversificada de microrganismos orais (Colby & Russel, 1997). Ela desempenha um papel na etiologia das doenças bucais como a cárie e gengivite. A sua formação depende de vários fatores, como por exemplo, a interação entre as bactérias e o dente, e pode ser caracterizado por quatro fases: formação de um filme condicionante, aderência, maturação e desenvolvimento. As bactérias do biofilme são envolvidas por uma massa de PEC (polissacarídeos extracelulares) resultante da aderência, multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre a superfície dentária. O dente é revestido por moléculas presentes na saliva, principalmente glicoproteínas ricas em prolina. Estas moléculas em contato com a hidroxiapatita presente nos dentes, sofrem alterações conformacionais e expõem um sítio adequado para a ligação dos primeiros colonizadores por meio de fímbrias (Matsumura *et al.*, 2003). Neste período inicial da colonização dos dentes, a película e os microrganismos são facilmente removidos, pois a interação é eletrostática. Não obstante, os *Streptococci* começam a multiplicar-se e sintetizar PEC e proteínas que promovem a consolidação da matriz, permitindo o estabelecimento de microrganismos que não têm estruturas de aderência.

O biofilme ecológico se desenvolve de forma equilibrada e estratificada e os microrganismos interagem formando co-agregados, estabelecendo cadeias alimentares e de tensão de oxigênio. Porém, microrganismos acidúricos (que sobrevivem em baixo pH) podem ser selecionados pela dieta rica em carboidratos e ausência de higienização adequada. No biofilme cariogênico haverá uma prevalência de *Streptococcus* do grupo *mutans*, principalmente *S. mutans* e outros microrganismos acidúricos como os lactobacilos e leveduras, os quais produzirão ácidos que resultam na desmineralização do dente (Kleinberg 2002; Socransky & Haffajee, 2002; Marsh *et al.*, 2005). Os trabalhos pioneiros de Shepan (1944) demonstraram que a cárie rampante está associada com a acidificação da placa, bem como a tolerância da microflora ao baixo pH.

Os *S. mutans* são mais resistentes aos ácidos (Grönroos, 2000), sendo que esta característica é regulada pelo sistema *Quorum Sensing* o qual é ativado para a tolerância ácida e formação do biofilme pela bactéria. (Li *et al.*, 2002).

A infecção por *S. mutans* inicia-se com sua adesão ao dente, um evento que é independente de sacarose e resulta da interação de adesinas bacterianas com glicoproteínas salivares que cobrem o dente. *S. mutans* pode aderir a aglutininas salivares, a outras bactérias da

placa ou receptores na superfície de células epiteliais. Esse processo de aderência e colonização é intermediado por proteínas, enzimas e complexos enzimáticos (Banas & Vickerman, 2003; Miranda *et al.*, 2001; Islam & Khan, 2007). Dentre as adesinas de *S. mutans*, destacam-se o receptor de superfície SpaP (também conhecido como Pac, antígeno I/II) (Jenkinson & Demuth, 1997) e o antígeno A associado à superfície celular (WapA) (Russel *et al.*, 1995; Jenkinson & Demuth, 1997). Foi demonstrado que os domínios ricos em prolina e alanina estão envolvidos na interação do antígeno I/II com componentes salivares, como as lectinas da película dental que recobre o dente (Banas & Vickerman, 2003). Apesar da presença das adesinas e sua comprovada interação com componentes salivares, estudos sugerem que *S. mutans* não são bons colonizadores primários dos dentes, devido a suas adesinas terem pouca afinidade à película adquirida em relação a outras bactérias (Kolenbrander & London, 1993).

Foi sugerido que a adesão dos *S. mutans* na placa dental também pode ser mediada por uma via dependente de sacarose, podendo envolver a ligação do glucano à bactéria ou a adesão dos *S. mutans* ao glucano na placa dental, já que *in vitro* na presença de sacarose os *S. mutans* se encobrem de glucano (Banas & Vickerman, 2003; Bowen & Koo, 2011).

S. mutans produz pelo menos quatro tipos distintos de proteínas ligantes aos glucanos, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. São proteínas extracelulares, normalmente associadas à parede celular da bactéria que, na presença de sacarose, formam uma "ponte" que liga as superfícies celulares destes microorganismos à matriz celular de glucanos (Banas & Vickerman, 2003). Estas proteínas também promovem a agregação dos *S. mutans* na presença dos glucanos.

A aderência dos *S. mutans* é mediada, portanto, por adesinas da superfície das bactérias associadas a fímbrias ou fibrilas e receptores da superfície oral que são componentes salivares como mucinas, glicoproteínas, amilase, lisozima, proteínas estaterinas e componentes bacterianos ligados à superfície oral (Rudney, 1995) constituídas de polissacarídeos, glicosiltransferases e lectinas, que são adesinas protéicas com afinidade específica por carboidratos.

Ao efetivar a adesão, a bactéria passa a depender de carboidratos para se nutrir e para produzir a matriz polissacarídica extracelular, que permite a adesão efetiva ao dente e a outras bactérias. A enzima glicosiltransferase é a principal conversora de açúcares em energia, garantindo a nutrição. É a responsável por metabolizar glucanos solúveis e insolúveis em água dando origem à matriz polissacarídica, que permite a colonização bacteriana sobre a hidroxiapatita do dente (Matsumura *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2001; Smith, 2002).

S. mutans produz pelo menos três GTFs geneticamente distintas, cada qual sintetiza uma estrutura de glucano distinta, vinda da sacarose. GtfB (também conhecida como GtfI) sintetiza primariamente glucanos insolúveis; GtfC (GtfSI) produz uma mistura de glucanos solúveis e glucanos insolúveis, enquanto GtfD (GtfS) forma predominantemente glucanos solúveis (Aoki *et al.*, 1986; Hanada & Kuramitsu, 1989).

Embora todas as três enzimas possam aderir à hidroxiapatita, sua afinidade a este substrato é bastante variável (Vacca-Smith & Bowen, 1998). GtfC possui uma grande afinidade pela hidroxiapatita, apresentando mais sítios de ligação em relação à GtfB ou GtfD. Dados de estudos *in situ* e *in vitro* mostraram que a Gtf inicialmente detectada na película é GtfC (Venkitaraman *et al.*, 1995; Vacca-Smith & Bowen, 2000).

GTFs também têm capacidade de se ligarem a muitas bactérias orais (McCabe & Donkersloot, 1987; Hamada & Torii, 1978; Vacca-Smith & Bowen, 1998), mesmo aquelas que não sintetizam GTFs. Foi demonstrado que GtfB, em particular, se liga com grande avidéz aos microorganismos orais como *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* e *S. mutans* (Vacca-Smith & Bowen, 1998).

As regiões C-terminais de GtfB e GtfC diferem em sua composição, o que pode explicar, em parte, a preferência de adsorção da enzima GtfC à hidroxiapatita, enquanto GtfB adere melhor à superfície de bactérias (Honda *et al.*, 1990).

Estudos demonstram ainda que as GTFs interagem com a amilase salivar (Vacca-Smith *et al.*, 1996). Uma vez que muitos microorganismos orais, incluindo *S. mutans*, adsorvem lisosimas, amilase e outras proteínas salivares (Douglas, 1983; Douglas & Russell, 1984; Ambatipudi *et al.*, 2010) a interação com amilase pode facilitar a ligação da GtfB à superfície celular das bactérias, permitindo a síntese de glucanos insolúveis diretamente em sua superfície (Vacca-Smith *et al.*, 1996; Chaudhuri *et al.*, 2007).

A hidrólise de amido, e sua digestão gradual pela alfa amilase salivar livre na solução, leva à adsorção da apatita dentro e na superfície da bactéria, também influenciando a formação dos glucanos pela GtfB (Vacca-Smith *et al.*, 1996).

Os glucanos solúveis podem ser rapidamente digeridos, atuando como reservas de energia para as bactérias. Além disso, contribuem para baixar o valor do pH durante a formação da placa cariogênica (revisado por Paes Leme *et al.*, 2006).

A Figura 01 mostra um esquema da formação do biofilme por *S. mutans*, com a participação das enzimas glicosiltransferases na degradação de carboidratos e adesão ao esmalte do dente.

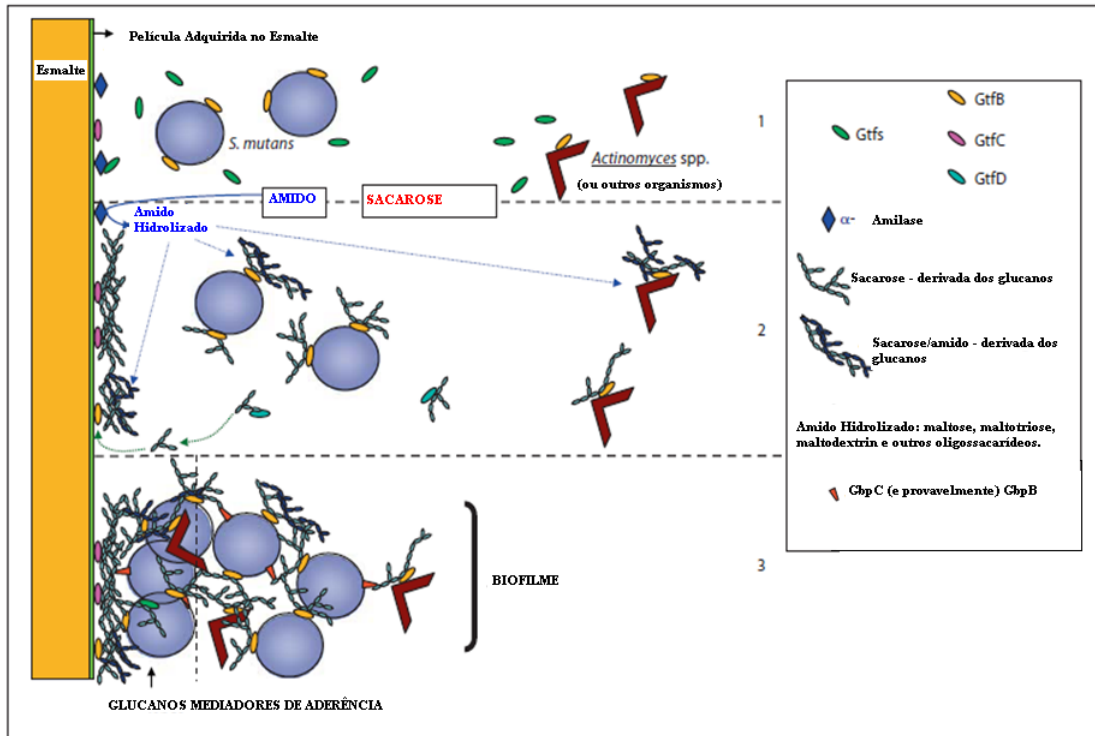


Figura 01 - Esquema da Formação do Biofilme oral a partir da formação de glucanos pelas enzimas GTFs, de *S. mutans*. Proposto por Rölla *et al.*, 1983, e revisado por Bowen & Koo, 2011).

Inicialmente, as GTFs secretadas pelo *S. mutans* são incorporadas dentro da película que recobre o dente (particularmente GtfC) e adsorvidas na superfície de diferentes bactérias (principalmente GtfB), incluindo microorganismos que não produzem GTFs (e.g. *Actinomyces* spp.). Em uma fase posterior, a alfa amilase da saliva é também incluída na película, e pode se ligar às GTFs. GtfB e GtfC da superfície rapidamente utilizam sacarose da dieta para sintetizar glucanos insolúveis e solúveis no local. O glucano solúvel formado pela GtfD pode funcionar como um “gatilho” para GtfB, aumentando a síntese de exopolissacarídeos. Concomitantemente, o amido é digerido pela amilase, produzindo maltose e uma grande quantidade de oligossacarídeos. Eles podem ser incorporados ao polímero através de reações catalisadas, principalmente, pela GtfB. As GTFs adsorvidas ao esmalte e às superfícies microbianas criam no

local uma matriz insolúvel para a placa dental. As moléculas de glucano promovem a ligação com a superfície do *S. mutans* (e outros microorganismos) mediante forte agrupamento da bactéria e aderência ao esmalte dentário. Em seguida, GTF adsorvida pelas bactérias produz glucanos que se ligam ao dente e a novas superfícies bacterianas pelos mesmos mecanismos. Este modelo pode explicar a rápida formação e acúmulo de uma placa coesiva e aderente na presença de sacarose (e também amido) mesmo com um número de *S. mutans* relativamente baixo. Depois do estabelecimento de uma matriz de biofilme rica em glucanos, pressões ecológicas (como pH) determinarão qual bactéria irá sobreviver e proliferar dentro da placa com freqüente exposição a sacarose (ou outros carboidratos fermentáveis).

A sacarose é um dissacarídeo formado pela ligação entre uma hexose (glicose) e uma pentose (frutose). A ligação glicosídica entre estas duas moléculas é rica em energia, sendo a sacarose o único açúcar a partir do qual as glicosiltransferases catalizam a síntese de glucanos. A partir da energia gerada pela hidrólise de n moléculas de sacarose, as GTFs produzem os polímeros de glicose, os glucanos, liberando n moléculas de frutose. A solubilidade destes polímeros é dependente da proporção de ligações do tipo alfa (1,3) e alfa (1,6). Alguns dos glucanos contendo moléculas de glicose com ligações alfa (1,3) são altamente insolúveis em água, rígidos e formam agregados fibrosos chamados mutanos. O glucano insolúvel formado pela GtfB e GtfC tem uma preponderância maior que 85% de cadeias alfa (1,3) entre as moléculas de glicose, e o restante sendo cadeias alfa (1,6) e alfa (1,3) (Fukushima e colaboradores, 1992). Por outro lado, os glucanos chamados dextranos, que tem ligações alfa (1,6) possuem cadeias flexíveis e são solúveis em água (Banas & Vickerman, 2003).

Os frutanos também são polissacarídeos extracelulares formados pela ligação de moléculas de frutose liberadas com a hidrólise de sacarose. A síntese de frutanos também ocorre extracelularmente, sendo catalizada pela enzima frutossiltransferase. Os frutanos são solúveis em água, assim, seu papel na formação da matriz extracelular é limitado. Acredita-se que o seu papel de virulência no *S. mutans* esteja no fato de atuarem como reservatórios extracelulares de substrato durante os períodos de escassez de nutrientes. Assim, nestas fases, exoenzimas denominadas frutanases (sintetizadas pelo *S. mutans*) hidrolizam estes polissacarídeos, para que os monossacarídeos de frutose sejam transportados para o interior das células e metabolizados (Taubman & Smith, 2005).

Com a formação do biofilme, a colônia bacteriana está mais protegida dos fatores imunológicos presentes na saliva. Porém, a presença da matriz, que torna o ambiente pouco permeável, e a produção de ácido como subproduto de seu metabolismo, diminui o pH do meio. A queda do pH ambiental é um fator de estresse, mas o *S. mutans* é capaz de modular seus mecanismos bioquímicos e fisiológicos de sobrevivência de acordo com a flutuação das tensões físico-químicas do meio no qual ele está inserido (Lemos & Burne, 2008).

1.3 Fatores de virulência de *S. mutans*

A virulência de *S. mutans* reside em três atributos essenciais: a habilidade para formar biofilme sobre a superfície do dente, a produção de grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogênicos) provenientes de grande variedade de hidratos de carbono, e tolerância ao estresse ambiental, particularmente pH baixo (Law *et al.*, 2007; Shaw, 1987; Shen *et al.*, 2004).

Proteínas associadas à superfície, como SpaP e Fap1, funcionam como adesinas de alta afinidade e estão diretamente envolvidas na iniciação do biofilme (Bowen *et al.*, 1991; Froeliger & Fives-Taylor, 2001; Oetjen *et al.*, 2001). Glucanos extracelulares sintetizados pelas GTFs são importantes na interação entre células e ligação de *S. mutans* a superfícies lisas, conforme discutido anteriormente. Proteínas de ligação a glucanos também estão envolvidas no acúmulo de bactérias em presença de sacarose (Sato *et al.*, 1997).

A proteólise também desempenha um papel importante no processamento e maturação de proteínas de superfície relacionadas à virulência da bactéria (Gottesman *et al.*, 1997). A proteína SpaP é encontrada na forma livre no sobrenadante da cultura, juntamente com fragmentos de diferente massa molecular (Russell *et al.*, 1980). A proteína WapA também é liberada por clivagem proteolítica (Ferretti *et al.*, 1989) e duas enzimas associadas à parede celular, dextranase e frutanasase, são encontradas predominantemente no sobrenadante das culturas (Burne & Penders, 1992; Igarashi *et al.*, 1992 e 1995). Além dos eventos proteolíticos que permitem a liberação destas enzimas e proteínas associadas à superfície celular, GTFs e frutossiltransferases também são clivadas em formas com menor massa molecular (Aduse-Opoku *et al.*, 1989; Russell *et al.*, 1986) e funcionam como proteínas de ligação a glucanos (Russell *et al.*, 1983). Assim, a expressão de várias proteínas de superfície é associada à proteólise, que pode influenciar

fortemente o nível de atividade e a localização celular destas proteínas. Uma enzima proteolítica importante de *S. mutans* é HtrA, envolvida na biogênese de proteínas extracelulares e enzimas glicolíticas, além de afetar a formação de biofilme (Biswas & Biswas, 2005).

A resistência ácida desempenha papel fundamental na virulência de *S. mutans*, e diversos componentes bacterianos têm sua expressão e ação reguladas por alterações de pH. A aciduridade é caracterizada pela expulsão de prótons H⁺ para fora da célula por uma proteína carreadora ou transportadora de membrana denominada F-ATPase, que em condições de baixo pH age como ATP-sintase, produzindo ATP para o crescimento e persistência da colônia. O excesso do subproduto H⁺ em contato com a hidroxiapatita leva à desmineralização do dente, com posterior formação da cárie dental (Lemos & Burne, 2008).

Outro mecanismo de resistência ácida é a produção de CO₂ e NH₄ por ureases ou pelo sistema de desaminase de arginina intermediada pela enzima AgDS. Esta enzima converte agmatina – um derivado carboxilado da arginina encontrado na placa dental – em putrescina, amônia e CO₂. Embora os baixos níveis de expressão de AgDS sugiram um papel reduzido desta enzima na alcalinização do meio externo, em pHs baixos, a agmatina pode contribuir para o fitness competitivo de *S. mutans*, aumentando o pH citoplasmático e gerando ATP, que pode ser usado para crescimento e eliminação de prótons (Lemos & Burne, 2008).

Sistemas de transdução de sinais de dois componentes (TCS) também desempenham papel importante na tolerância ácida por *S. mutans*. Em particular os sensores quinases de localização superficial atuam como importantes fatores de virulência, permitindo que a bactéria regule seu metabolismo de acordo com as alterações no meio externo. A análise do genoma de *S. mutans* revelou a presença de 13 TCS putativos (Ajdic *et al.*, 2002), e um estudo de Biswas e colaboradores identificaram uma 14^o quinase (Biswas *et al.*, 2008). A análise de cepas mutantes para os diferentes sistemas de transdução de sinais apontou três quinases, Smu486, Smu1128, e Smu1516, que são importantes na regulação das respostas de tolerância ao estresse em *S. mutans* (Biswas *et al.*, 2008).

Foi identificada uma enzima de reparo celular que, em pH baixo, modula o espessamento da parede, aumentando a produção de lipídeos na membrana para diminuir a permeabilidade de H⁺. Esta enzima é denominada SmX e é codificada pelo gene do mesmo nome, sendo que esta transcrição é regulada pelo gene *agu R* que codifica um regulador transcricional tipo Lux R (Lemos & Burne, 2008).

1.3.1 Mutacinas

Devido à ampla gama de microrganismos que habitam a cavidade oral, bactérias capazes de produzir substâncias inibitórias contra outras bactérias competidoras tem vantagens adaptativas para a colonização primária do ambiente. Dentre as substâncias antibióticas de *S. mutans*, as mutacinas exercem papel importante no estabelecimento desta bactéria para formação do biofilme (Parrot *et al.*, 1990).

Estudos demonstraram que a presença das mutacinas está relacionada à prevalência de *S. mutans* na cavidade oral. De acordo com Nyvad & Kilian (1990), pacientes com cárie são mais colonizados por bactérias cariogênicas, considerando que os indivíduos livres de cárie abrigam uma maior prevalência de *S. sanguis* e outros *Streptococcus* do grupo *mitis*. Isto explicaria a maior atividade da mutacina contra outras bactérias que colonizam a cavidade oral em indivíduos com cárie.

Grönroos & Alaluwsua (1998), analisaram o nível da atividade das mutacinas de *S. mutans* isolados da cavidade bucal de 19 pares mãe-filho, sendo que as crianças possuíam de 18 meses a 3 anos de idade. Foi observado que 88% das cepas produziram mutacina contra mais de 1 das 14 cepas indicadoras, representadas por *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *S. pyogenes*. As cepas de *S. mutans* mostraram maior atividade inibitória que as cepas de *S. sobrinus*. As cepas de *S. mutans*, compartilhadas entre a mãe e a sua criança, mostraram atividade inibitória de amplo espectro, se comparadas às cepas que não foram transmitidas. Eles concluíram que os isolados clínicos, apresentaram uma boa produção de mutacinas e que este fator de virulência foi visto como sendo de grande importância clínica na colonização inicial pelo *S. mutans*.

As bactérias produtoras de mutacinas podem ser classificadas conforme sua atividade bactericida em 4 tipos: as mutacinas I, II e III são inibitórias para uma gama de microrganismos gram-positivos, enquanto a mutacina IV é eficaz principalmente contra *Streptococcus* orais do grupo *mitis* (Qi *et al.*, 1999 a, b). Em outro estudo, Qi *et al.* (2001), caracterizaram as mutacinas como lantibióticas ou não lantibióticas. A lantibióticas ou classe I, inclui as mutacinas I, II e III. A mutacina IV pertence ao grupo das não lantibióticas ou classe II.

Baseando-se nas propriedades seletivas e ecológicas das mutacinas *in vivo*, foi desenvolvida a terapia de substituição bacteriana para prevenção do desenvolvimento da cárie

dental (Hillman *et al.*, 2000). Através da construção de uma cepa mutante *S. mutans* BCS3-L1, produtora de mutacina de amplo espectro *in vivo* (mutacina 1140) e defectiva na produção de ácido láctico, foi possível efetivar a colonização da cepa produtora de baixo potencial cariogênico na cavidade oral de ratos. A atividade biológica da mutacina produzida *in vivo* reduziu o índice

Van Loveren *et al.* (2003), compararam as atividades das mutacinas de *S. mutans* isolados das mães, pais e filhos. Onze famílias foram selecionadas randomicamente para a coleta da saliva e isolamento dos *S. mutans*. As pesquisas mostraram que havia uma similaridade na produção, tanto das mutacinas, quanto dos *S. mutans* da mãe, do pai e também dos filhos, indicando que a transmissão entre os membros da família havia ocorrido.

Longo *et al.* (2003), avaliaram a produção de mutacinas pelos *S. mutans* e a diversidade genotípica dos mesmos em crianças com cárie e sem cárie. Os autores mostraram que as mutacinas podem aumentar a capacidade de colonização dos *S. mutans* e de reduzir a infecção por tipos sensíveis. Porém, a análise estatística não conseguiu mostrar uma relação entre atividade de cárie e os níveis de infecção pelos *S. mutans*. A relação de produção de mutacinas e a presença ou não de cárie também não foi estatisticamente determinada. Neste trabalho, Longo *et al.* (2003), analisaram 19 genótipos de isolados de crianças e somente em um tipo encontraram sequência homóloga ao gene da mutacina II.

Kamiya *et al.* (2005), estudando a correlação entre frequência de genes de mutacina em voluntários com e sem cáries, verificaram a prevalência de mutacina IV nas bactérias isoladas de indivíduos com cárie, que se correlacionou com um maior efeito inibitório sobre um painel de microrganismos orais. Este tipo de mutacina é produzido principalmente por células planctônicas (Qi *et al.*, 2001), sugerindo um papel importante nos eventos iniciais da colonização por *S. mutans*, antes da formação do biofilme. A presença de mutacina IV promove a redução dos colonizadores primários do dente, permitindo a colonização desta superfície pelo *S. mutans*. A mutacina I, por outro lado, é mais expressa nas células do biofilme, sugerindo um papel nas etapas mais tardias da infecção por *S. mutans*.

1.4 Vacinas contra *S. mutans*

O *S. mutans* foi isolado de uma lesão cáriosa pela primeira vez por Clark, 1924 apud Hamada & Slade, 1980 e a devida importância só foi atribuída 40 anos mais tarde quando Loesche *et al.* (1964), comprovaram que *S. mutans* seria o principal agente etiológico da cárie. Passou-se desde então a busca por uma maneira de induzir competência imunológica que protegesse o indivíduo da infecção por esta bactéria.

Muitos estágios da patogenia molecular da cárie dental são susceptíveis à intervenção imune. Microrganismos podem ser inativados na cavidade oral por um anticorpo agregado enquanto está ainda na fase salivar, antes da colonização. Anticorpos poderiam também bloquear os receptores necessários para a colonização (como adesinas) ou acumulação (como os glucanos glucanos. Modificações no metabolismo de importantes funções celulares também podem ser o alvo. Além do mais, a atividade antimicrobiana do anticorpo da IgA salivar pode ser aumentada ou redirecionada por um sinergismo com componentes inatos da imunidade como a mucina ou a lactoferrina.

Os primeiros esforços na busca por uma vacina contra a cárie avaliaram o potencial imunogênico da injeção de bactérias inativadas por calor, que resultou em um aumento da secreção de anticorpos nos indivíduos imunizados, porém não houve proteção contra a doença (Gombôs *et al.*, 1980).

Em 1990, Bayona-Gonzales e colaboradores, realizaram um ensaio clínico para avaliar a eficácia da utilização de bactérias inativadas na imunização contra a cárie. Foram administrados tabletes mastigáveis com 10 miligramas de piridoxina contendo algumas cepas de *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Os resultados demonstraram uma redução de 42% na incidência de cárie nos indivíduos imunizados. Também foram testadas vacinas de subunidades, utilizando antígenos (glicosiltransferase) em lipossomos desidratados. Sete adultos com idade entre 21 e 38 anos foram imunizados com esta formulação, e foi observado aumento de 77% nos níveis de IgA (Childers *et al.*, 1994). Um estudo mais recente demonstrou que a imunização por via intranasal com GTF em adultos voluntários induziu um aumento nos níveis de IgA específica para o patógeno (Li *et al.*, 2003). Em 2006, Han e colaboradores estudaram a eficiência imunológica de uma vacina composta por uma proteína de superfície do *S. mutans* (WapA) que participa do processo de aderência do microorganismo ao dente. Foram aplicadas duas doses no intervalo de

três semanas em um grupo de ratos. Foram encontrados níveis elevados de IgA nos animais imunizados, que se correlacionaram com a inibição da aderência da bactéria ao dente mediada por sacarose na presença do anticorpo anti WapA.

A imunização de ratos com GbpB, induziu resposta imune capaz de reduzir o acúmulo de *S. mutans* durante a formação do biofilme e, conseqüentemente, os níveis de cárie dental (Smith & Taubman, 1996).

Estratégias de imunização de mucosa foram desenvolvidas para induzir altos níveis de anticorpos salivares que podem persistir por período prolongado e fortalecer a memória imunológica. Estudos realizados demonstraram que a imunização de roedores experimentais ou primatas com antígenos protéicos de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* por via oral reduz a colonização por *Streptococcus* do grupo *mutans* e o desenvolvimento da cárie dental (Russell *et al.*, 2006). A proteção tem sido atribuída a anticorpos IgA salivares, que podem inibir o acúmulo de bactérias sacarose-independente ou sacarose-dependente em superfícies dentárias, de acordo com a escolha do antígeno. Estudos em humanos mostram que anticorpos salivares de estreptococos do grupo *mutans* podem ser induzidos por abordagens semelhantes, e que os anticorpos passivamente aplicados também podem suprimir a re-colonização oral por *S. mutans* (Russell *et al.*, 2006).

As adesinas do *S. mutans* (identificadas como antígeno I/II, Pac, ou P1) tem sido estudadas enquanto candidatos a vacinas orais contra *S. mutans*. O antígeno I/II contém uma sequência rica em alanina na região *n* terminal, e outra rica em prolinas na região central da molécula, que têm sido associadas com a atividade adesiva destas moléculas (Crowley *et al.*, 1993; Nakai *et al.*, 1993). Estes dados são corroborados pelos estudos de Lehner *et al.*, (1994), mostrando que fragmentos recombinantes contendo a porção central de antígeno I/II induzem uma inibição da adesão à película dentária. De forma semelhante, anticorpos direcionados ao antígeno I/II intacto ou nas ligações salivares bloquearam a aderência do *S. mutans* na saliva que cobre a hidroxiapatita (Hajishengallis *et al.*, 1992). Diversos estudos demonstraram que a imunização ativa com o antígeno I/II (Lehner *et al.*, 1981; Katz *et al.*, 1993) ou imunização passiva com monoclonal (Ma *et al.*, 1990) ou anticorpo transgênico (Ma *et al.*, 1999), protege roedores, primatas ou humanos da cárie causada pelo *S. mutans*.

Estudos envolvendo a atenuação genética de *S. mutans* têm gerado resultados promissores em diversos modelos. A redução na síntese de glucanos insolúveis através de mutagênese sítio-

dirigida do gene que codifica GbpC resultou em inibição da formação de biofilme por *S. mutans* e redução da formação de cáries em ratos (Nakano *et al.*, 2002; Thibodeau & Ford, 1991; Bensing *et al.*, 2001).

De forma semelhante, bactérias mutantes para os genes *gtf* (principalmente *gtfB* e *gtfC*) mostraram-se eficazes na redução cárie, pela inibição na produção de glucanos insolúveis em água. A inativação de *gtfD* também mostrou resultado semelhante, gerando um mutante com baixa cariogenicidade em superfícies lisas (Yamashita *et al.*, 1993). Finalmente, a administração passiva oral do anticorpo contra GTF também foi capaz de inibir o desenvolvimento da cárie em ratos (Hamada *et al.*, 1991).

Outro fator de grande importância na diminuição da doença cárie é a capacidade de alterar ou danificar a habilidade que os *S. mutans* tem de se ligar aos glucanos. Dentre as proteínas de ligação a glucanos, somente a GbpB mostrou a indução de uma resposta imune protetora em modelos animais de cárie (Smith & Taubman, 1996; Smith *et al.*, 1997). Esta proteção foi obtida através da injeção subcutânea ou intranasal de GbpB (Smith *et al.*, 1997 a) ou ainda pela injeção do antígeno diretamente na região da glândula salivar (Smith & Taubman, 1996). A saliva de crianças não imunizadas contém anticorpos IgA para GbpB, indicando que a infecção por *S. mutans* desencadeia uma imunidade natural contra esta proteína.

De maneira geral, as vacinas de subunidade compreendem uma estratégia de imunização promissora contra *S. mutans*, por serem capazes de ativar uma imunidade de mucosa e reduzir o estabelecimento de lesões cariosas.

1.5 *S. mutans* e BrpA

O gene *brpA* (sigla em inglês para *biofilm regulatory protein A*), também conhecido como *lytR*, foi identificado através de uma busca por reguladores transcricionais no genoma de *S. mutans* UAB159 (Wen & Burne, 2002). Codifica uma proteína predita como associada à membrana, com uma cauda rica em serinas que se estende para a parede celular.

BrpA atua como sensor ambiental, capaz de identificar e sinalizar alterações ambientais, modulando a competência da parede celular, lise e multiplicação celular (Lemos & Burne, 2008; Biswas *et al.*, 2008).

Estudos utilizando mutantes negativos para o gene *brpA* demonstram que esta proteína está envolvida na regulação da modulação de competências ácida e oxidativa, lise e reprodução celular, que são atributos fundamentais da tolerância ao estresse ambiental e formação do biofilme (Merritt *et al.*, 2003; Wen & Burne, 2002; Wen *et al.*, 2005). Essa proteína também sinaliza a modulação da ATPase e transporte de H⁺ para o exterior da célula. O excesso do subproduto de H⁺ em contato com a hidroxiapatita leva à desmineralização do dente e, posteriormente, à cárie (Burne, 1998).

Observou-se que bactérias mutantes negativas para *brpA* formam cadeias com o dobro do número de células quando comparadas com bactérias selvagens. Além disso, estas bactérias mutantes não possuem capacidade de formar um biofilme maduro em superfícies de poliestireno. Ao contrário das bactérias selvagens, que formam biofilmes altamente adesivos, os mutantes formam uma massa ampla de células facilmente removíveis pela lavagem (Wen & Burne, 2002; Yoshida & Kuramitsu, 2002). Tais defeitos interferem primariamente na acumulação celular e na adesão inicial necessária ao desenvolvimento do biofilme. Um estudo mais recente demonstrou que mutantes *brpA* negativos, apesar de formar longas cadeias dispersas e microcolônias na superfície de discos de hidroxiapatita, não foram capazes de acumular e desenvolver biofilmes tridimensionais, sugerindo que *brpA* também interfere em estágios mais tardios da formação do biofilme (Wen *et al.*, 2006).

Relatou-se também que os biofilmes formados pelo mutante deficiente foram finos e relativamente dispersos em relação à distribuição do biofilme formado pelo tipo selvagem. Além disso, observou-se também maior quebra e fragmentos de células no biofilme da bactéria mutante em relação ao biofilme da bactéria selvagem, resultado de um aumento da autólise no tipo mutante (Chatfield *et al.*, 2005; Wen & Burne, 2002).

A complementação das bactérias mutantes com o gene *brpA* levou à obtenção de cadeias com comprimento similar à formada pelas bactérias selvagens, bem como ao restabelecimento da capacidade de formar biofilmes. Em conjunto, estes resultados confirmam que o fenótipo observado no tipo mutante é resultado da perda do gene *brpA* (Wen *et al.*, 2006).

A formação de longas cadeias, aliada à redução da capacidade adesiva e de acumulação, levam à redução na tolerância da bactéria mutante deficiente em *brpA* à acidificação do ambiente externo. Como resultado, *S. mutans brpA*-negativos apresentam um aumento significativo na

susceptibilidade ao estresse, e conseqüentemente, um menor potencial cariogênico (Chatfield *et al.*, 2005).

As propriedades de tolerância ao estresse do tipo selvagem e do tipo mutante deficiente foram analisadas pela morte ácida e pela disputa ao peróxido de hidrogênio (Wen & Burne, 2004). Foi mostrado que mutantes deficientes em *brpA* apresentam maior susceptibilidade tanto à morte ácida quanto ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio. Como esperado, a complementação com o gene *brpA* restaurou a capacidade de tolerar o estresse ácido no mutante. Observações similares da diminuição da tolerância ácida em bactérias *brpA*-negativas foram também encontrados por Nakano *et al.*, (2005).

Foi observado um aumento na autólise como resultado da deficiência de *brpA* (Chatfield *et al.*, 2005; Wen & Burne, 2002). Este efeito pode contribuir, pelo menos em parte, no aumento observado na susceptibilidade do mutante ao ácido e ao estresse oxidativo. Além disso, a formação das longas cadeias pelo tipo mutante poderia aumentar o descolamento ou reduzir a aderência do biofilme (Chatfield *et al.*, 2005; Wen & Burne, 2002).

Estudo utilizando eletroforese bidimensional de extratos de células do tipo selvagem e mutante evidenciou que BrpA pode ter efeitos globais na expressão gênica de *S. mutans*. A comparação do perfil protéico revelou mais de 100 proteínas com expressão alterada no mutante, em comparação com as bactérias selvagens (Wen *et al.*, 2006). A influência de BrpA sobre a regulação gênica foi confirmada através de análise de *microarray*, onde foram identificados mais de 200 genes com expressão ativada ou inibida nos mutantes *brpA*-negativos. Entre os genes com expressão aumentada, estão aqueles envolvidos na tolerância ao estresse oxidativo, como os codificantes de SOD, Nox e Dpr, sugerindo que a perda de *brpA* sinaliza estresse oxidativo para a bactéria. No entanto, o mutante apresenta alta susceptibilidade ao estresse oxidativo, sugerindo que outros fatores, como defeitos na formação do envelope externo, estejam envolvidos. Genes que codificam GbpD, a proteína RecA e o operon F1F0 – que codifica a ATPase responsável pela manutenção do pH em *S. mutans* – foram inibidos no mutante, contribuindo para maior susceptibilidade ao estresse. GbpD tem a capacidade de se ligar aos glucanos e a deficiência do GbpD causaria diminuição na hidrofobicidade da bactéria, afetando sua adesão a superfícies duras. Além disso, GbpD apresenta atividade de lipase e estaria envolvida na biogênese da membrana (Shah & Russel, 2004), o qual afetaria a composição ou integridade da célula e

possivelmente contribuiria para o fenótipo mais sensível ao estresse nos mutantes deficientes em BrpA.

De forma semelhante, a inibição da expressão de F1F0-ATPase nas bactérias *brpA*-negativas contribui para o aumento da sensibilidade ácida no mutante (Wen *et al.*, 2006). Em conjunto, estes resultados sugerem que as mudanças na expressão gênica em resposta à perda de BrpA são responsáveis pelos defeitos na formação do biofilme e na tolerância ao estresse oxidativo (Wen *et al.*, 2006).

Interessantemente, estudos de Nakano *et al.*, (2005), demonstram que cepas deficientes em BrpA são mais dificilmente fagocitadas pelos leucócitos polimorfonucleares humanos e induzem um aumento da agregação plaquetária e da duração da bacteremia, sugerindo que o BrpA poderia estar envolvido na virulência sistêmica no sangue. Naquele estudo, quatro tipos de *S. mutans* foram isolados do sangue de pacientes com bacteremia após extração dentária e de pacientes com endocardite infecciosa, sendo que todos eles possuem menor susceptibilidade fagocitária em relação a um tipo selvagem (Nakano *et al.*, 2005). A análise comparativa das proteínas de superfície das bactérias revelou a presença de alterações na proteína de ligação a glucanos C (GbpC), que se correlacionou com a susceptibilidade fagocitária *in vitro* bem como a longa duração da bacteremia *in vivo* (Nakano *et al.*, 2005). A hidrofobicidade da bactéria mutante também foi bem mais alta em relação à selvagem e está associada à formação de cadeias mais longas (Nakano *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que a perda de BrpA reduz a susceptibilidade à fagocitose e aumenta a virulência sistêmica não pelo efeito direto de BrpA, mas pela produção de longas cadeias pela ausência do gene *brpA* (Nakano *et al.*, 2005).

Foi observada ainda a indução de agregação plaquetária pelas bactérias mutantes, o que aumentaria sua virulência na bacteremia ou endocardite infecciosa (Nakano *et al.*, 2005). Outra propriedade, já citada, do mutante, é o baixo padrão de sobrevivência em meio ácido, lembrando que na cavidade oral isto seria uma desvantagem para sua sobrevivência. No sangue, entretanto, onde os valores de pH são próximos à neutralidade, a maior susceptibilidade à acidificação não reduz a sobrevivência, o que pode explicar em parte as diferenças na virulência destes mutantes nos ambientes oral e sanguíneo.

A evidente contribuição de BrpA para a virulência de *S. mutans*, aliada à sua localização predita no envelope bacteriano, indicam esta proteína como candidata para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade capaz de conferir imunidade protetora contra esta bactéria. Espera-se

que a modulação das competências relacionadas com a BrpA seja inibida, reduzindo dessa forma a atividade cariogênica do *S. mutans*, prevenindo o acúmulo bacteriano na superfície do dente e a formação de biofilme maduro.

2. OBJETIVO

Os objetivos do presente trabalho são:

1. Traçar um perfil de susceptibilidade à cárie em crianças, com base em fatores microbianos e do hospedeiro.
2. Avaliar a produção de anticorpos contra a proteína reguladora de biofilme A (BrpA) em camundongos.

Os objetivos parciais são:

- Analisar comparativamente amostras de *S. mutans* isoladas de crianças com e sem cárie, com relação à presença de fatores de virulência específicos (gene para a mutacina IV e formação de biofilme *in vitro*).
- Analisar comparativamente amostras da saliva de crianças com e sem cárie, com relação ao potencial aglutinante.
- Produzir BrpA de forma recombinante.
- Avaliar a imunogenicidade de BrpA recombinante em camundongos.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (protocolo nº 0077.0.142.000-10 – Anexo I) e animais (Anexo II) da Universidade São Francisco.

3.2 Coleta das amostras de saliva

Foram enviados 40 termos de consentimento para os pais para a coleta da saliva de seus filhos, dos quais 26 foram devidamente assinados. Assim, amostras de saliva (cerca de 2mL) foram coletadas de 26 crianças com idade entre 7 e 10 anos, estudantes de duas escolas da rede pública do município de Camanducaia, após consentimento assinado pelos pais, diretoras e pela secretária de saúde. As amostras de cada escola foram classificadas em dois grupos: indivíduos com e sem cáries, conforme esquematizado na Figura 02.

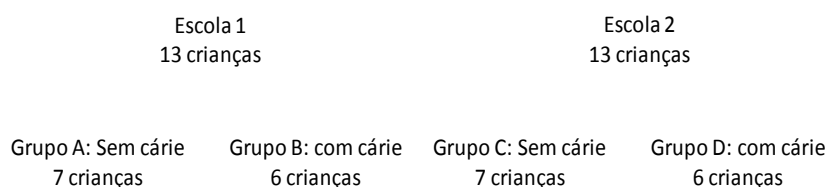


Figura 02. Distribuição das amostras de saliva em crianças com e sem cárie nas escolas 1 e 2.

Aos responsáveis pelas crianças, foi enviado um questionário de hábitos diários, onde foram incluídos os seguintes itens:

- Número de escovações diárias
- Realização de escovação antes de dormir
- Escovação da língua
- Presença de água fluoretada no domicílio
- Uso de enxaguante bucal

- Consumo de doces
- Consumo de refrigerantes
- Presença de respiração bucal

No momento da coleta, foi realizado um exame clínico da cavidade oral da criança, onde foram avaliados os seguintes critérios:

- Presença de lesões cariosas
- Presença de biofilme (massa esbranquiçada sobre a superfície dental)
- Presença de resíduos alimentares entre ou sobre os dentes
- Limpeza da língua
- Presença de gengivite

Os critérios “presença de biofilme”, “presença de resíduos alimentares”, “limpeza da língua” e “gengivite” foram agrupados no critério geral “higiene bucal”.

As crianças não consumiram alimentos ou líquidos por 1 hora antes da coleta. Nenhuma outra restrição alimentar foi aplicada às crianças. Para o isolamento de *S. mutans*, uma alíquota de 100 µL foi imediatamente transferida para 1 mL de meio TSB (Oxoid) suplementado com 10% de glicerol. As amostras foram transportadas acondicionadas a 0 °C e congeladas a -80 °C até a análise.

A comparação entre as respostas do questionário para os grupos com e sem cárie foi realizada através do teste exato de Fisher.

3.3 Isolamento de *S. mutans* da saliva

Para o isolamento de *S. mutans*, os tubos contendo saliva em TSB foram descongelados e homogeneizados em vortex por 1 min. As amostras foram então plaqueadas em meio Ágar Mitis Salivarius suplementado com bacitracina (0.2 U/mL, que é seletivo para *S. mutans*) e 20% de sacarose, e incubadas em anaerobiose por 72 horas a 37 °C.

As colônias foram submetidas à prova da catalase, e as que obtiveram resultado negativo – indicativo de *S. mutans* – foram cultivadas em 5 mL de meio de enriquecimento BHI (Himedia) por 24 horas. Os cultivos frescos foram submetidos à coloração de Gram, e as amostras Gram-positivas foram congeladas a -80 °C.

3.4 Extração do DNA cromossomal de *S. mutans*

A extração do DNA foi realizada a partir da cultura das amostras isoladas após 24 horas de incubação a 37 °C, utilizando método adaptado de Welsh & McClelland (1990). As células foram centrifugadas a 8000 rpm por 3 minutos, lavadas com TE (Tris 10 mM / HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e fervidas por 10 min no mesmo tampão. Seguiu-se nova centrifugação e os sobrenadantes contendo o DNA cromossomal das bactérias foram utilizados nas reações de PCR.

3.5 Análise da virulência de *S. mutans*

3.5.1 Amplificação do gene da Mutacina IV a partir dos isolados de *S. mutans*

A presença do gene de mutacina IV em *S. mutans* foi realizada por PCR das bactérias isoladas da saliva, utilizando-se primers específicos. Os genes de *gtfB* e *brpA* foram utilizados como controle positivo. As sequências dos primers utilizados nas reações estão descritas a seguir:

Mutacina IV (Qi et al., 2001)

Primer mut IV Sense: 5' ATG GGA TAT TTA AAG GGA AA 3'

Primer mut IV Anti-sense: 5' TCA GAG CAG CTA CAA AAA CT 3'

brpA (Ajdic et al., 2002).

Primer brpA Sense: 5' CTT GAG ATG AAG ATT GGT AAA AAA AT 3'

Primer brpA Anti-sense: 5' GAA TTC TTA ATT ACC AAT TCC CGT TCC 3'

GtfB (região de ligação a glucanos) (adaptado de Jespersgaard et al., 1999).

Primer GTFB Sense 5' CTC GAG ATG CGT GTT GAT AAG TAT GGG ACT 3'

Primer GTFB Anti-sense 5' GAA TTC TTG AGA TCC TGT CAC TGC TG 3'

3.5.2 Ensaio de aderência dependente de sacarose de *S. mutans*

A aderência de *S. mutans* em repouso foi determinada através de ensaio de formação de biofilme em placa de 96 poços, adaptado de Banu *et al.* (2010). Estoques congelados de bactérias isoladas da saliva de crianças com e sem cárie foram plaqueados em BHI e cultivados a 37 °C em anaerobiose por 16 horas. Colônias foram transferidas para 2 mL de meio BHI líquido e cultivadas nas mesmas condições até atingirem DO₆₀₀ 0,4-0,5. Em seguida, as amostras foram diluídas em meio BHI suplementado com 20% de sacarose até DO₆₀₀ 0,1 e transferidas para a microplaca de 96 poços (alíquotas de 200 µL por poço). A placa foi incubada a 37 °C durante 20 horas, e a absorbância das amostras foi aferida em leitor de placa da marca Eppendorf. Os sobrenadantes foram descartados, e a placa, lavada duas vezes com PBS estéril. Os biofilmes foram fixados por 15 minutos em metanol 99% e corados com fucsina 0,1% por 5 minutos. A placa foi novamente lavada com PBS e seca a 30 °C por 30 minutos. Os biofilmes foram quantificados pela medida da absorbância a 492 nm em leitor de placas, seguida pela normalização dos valores a partir das medidas dos cultivos. A comparação entre as amostras de crianças com e se cárie foi feita pelo teste de Mann-whitney.

3.6 Medida da capacidade aglutinante da saliva

A capacidade aglutinante da saliva foi medida por espectrofotometria em microtubo de 1,5mL. O isolado de *S. mutans* B3 (com cárie) foi cultivado em BHI até D.O.₆₀₀ 0,5 centrifugado, e o pellet lavado com PBS estéril. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para o microtubo e foram adicionados 100µL de cada amostra de saliva e PBS até completar volume final de 1mL por tubo. Os tubos foram incubados por 1 h a 37 °C, e a absorbância a 600 nm foi medida nos tempos 0 e 1h. Como controle, foi utilizada apenas a suspensão bacteriana em PBS. A comparação entre as amostras de saliva foi feita pelo teste de Mann-whitney.

3.7 Avaliação imunológica de BrpA

3.7.1 Clonagem do gene *brpA* em vetor de expressão em procariotos

O gene *brpA* foi amplificado a partir do DNA cromossomal de *Streptococcus mutans* isolado da amostra de saliva B3, utilizando-se primers descritos no item 3.5.1

As condições da amplificação foram:

1. 94 °C 5 minutos → Denaturação inicial
2. 94 °C 1 minuto → Denaturação
3. 50 °C 1 minuto → Anelamento dos oligonucleotídeos
4. 72 °C 2 minutos → Elongação
5. 72 °C 10 minutos → Elongação final

Etapas 2 a 4 repetidas 30 vezes

Ao término da reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, e a banda com tamanho correspondente ao gene *brpA*, cortada e purificada com auxílio do kit GFX (GE HealthCare). A clonagem em vetor de expressão foi realizada em duas etapas. Primeiramente, o gene *brpA* purificado foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega), e o produto da ligação, pGEM-T Easy-*brpA*, transformou *E. coli* DH5- α . As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB (Luria-Bretani – Himedia) contendo 100 μ g/mL de ampicilina (LBamp) e incubadas a 37 °C durante 16 horas. Uma colônia bacteriana foi cultivada em meio líquido LB contendo ampicilina (LBamp), e o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit Plasmid Prep (GE HealthCare).

A segunda etapa da clonagem iniciou-se com a digestão enzimática do vetor pGEM-T Easy-*brpA* com as enzimas *Xho* I e *Eco*R I (Fermentas), seguida pela eletroforese em gel de agarose 1% para separação do gene *brpA*. A banda correspondente ao gene foi excisada, purificada e ligada ao vetor de expressão pAE (Ramos *et al.*, 2004), previamente digerido com as mesmas enzimas. O produto da ligação, pAE-*brpA*, transformou *E. coli* DH5- α e, após nova incubação em meio líquido, os plasmídeos foram purificados e armazenados.

3.7.2 Produção da proteína BrpA em *E. coli*

A expressão de BrpA foi realizada em *E. coli* BL21(DE3), pela indução dos cultivos em D.O. 0,7-0,8 com 1 mM de IPTG durante 3 horas. A análise da expressão foi feita utilizando-se 1 mL dos cultivos induzido e não-induzido. Quatro amostras representando clones bacterianos distintos foram cultivadas, tiveram a expressão quimicamente induzida, e foram então centrifugadas, ressuspendidas em tampão de aplicação (Tris 250 mM, SDS 1%, contendo β -mercaptoetanol e glicerol) e 10 μ L de cada fração das amostras (solúvel e insolúvel) foram aplicados em gel de poliacrilamida 12%. Após a análise das proteínas em gel, 1 clone positivo foi selecionado para expressão em larga escala. Este clone foi inoculado em 20 mL de meio LB amp durante 16 h, diluído em 300 mL de meio novo e cultivado de forma semelhante às amostras da expressão analítica. Após a indução, o cultivo foi centrifugado, e o pellet, lisado quimicamente pela adição de 15 mL do detergente B-Per (NOVAGEN) e 1 μ L de Dnase (Sigma), com incubação durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, a amostra foi centrifugada e a fração solúvel, purificada por cromatografia de afinidade ao Ni^{+2} , com auxílio do aparelho Akta Prime (GE HealthCare). Inicialmente, a amostra foi passada através da coluna contendo a resina carregada com Ni^{+2} , seguida pela lavagem com tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, NaCl 150mM). Para a eluição, foi utilizada solução de Imidazol a 400 mM em tampão de equilíbrio. A proteína purificada foi submetida à diálise no tampão de equilíbrio descrito anteriormente para remoção do imidazol, e quantificada pelo método de Bradford (Sambrook *et al.*, 2006).

3.8 Imunização de camundongos

Cinco camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados pela via intraperitoneal (ip) com três doses de BrpA (10 μ g/animal/dose) utilizando-se 100 μ g de hidróxido de alumínio (Alum) como adjuvante, em intervalos de 7 dias. Outros cinco animais (grupo controle) foram imunizados com Alum, apenas. A coleta do sangue foi realizada por punção retro-orbital 7 dias após a última imunização. O material foi centrifugado, e o plasma contendo os anticorpos, armazenado a -20 °C.

3.9 Análise da produção de anticorpos anti-BrpA

A produção de anticorpos anti-BrpA foi analisada por ELISA. As placas foram inicialmente incubadas com 1µg/mL de BrpA recombinante em tampão Carbo nato-Bicarbonato 50 mM, pH 9,6 (1µg/mL) e permaneceram a 4 °C por "overnight". Para a curva padrão, utilizou-se IgG de camundongo (Sigma). Após esse período, as placas foram incubadas por 30 min a 37 °C e lavadas 3 vezes com PBS (pH 7,2) + Tween 20 (0,1%). O bloqueio foi realizado com leite 10 % em PBS (200 µL/poço), a 37 °C por 30 minutos, seguido por 3 lavagens em PBS + Tween. O soro obtido dos camundongos imunizados foi adicionado em diluições sequenciais em PBS/BSA 1% (100 µL / poço) e incubado a 37 °C durante 1 hora. Após 3 novas lavagens com PBS + Tween 20, o anticorpo secundário, "goat anti-mouse IgG" (Sigma), foi diluído a uma razão de 1:4000 em tampão PBS/BSA e adicionado(100 µL/poço). Seguiu-se nova incubação a 37 °C por uma hora e, após lavagens, foi adicionado o anticorpo final conjugado (*anti-goat peroxidase-HRP*, Sigma) diluído a uma razão de 1:20000 em PBS/BSA. Após 1 hora de incubação, as placas foram novamente lavadas 3 vezes, e o substrato (8 mg de OPD em 20 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e 10 mL de H₂O₂), adicionado (100 µL/poço). Após dez minutos de incubação no escuro, a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 8N (50µL/poço) e a absorbância das amostras a 492 nm foi determinada. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste T de Student.

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos questionários

Os dados sobre os hábitos diários das crianças envolvidas no estudo, coletados por meio de questionário enviado aos pais, estão compilados na Tabela 01 e Figura 03.

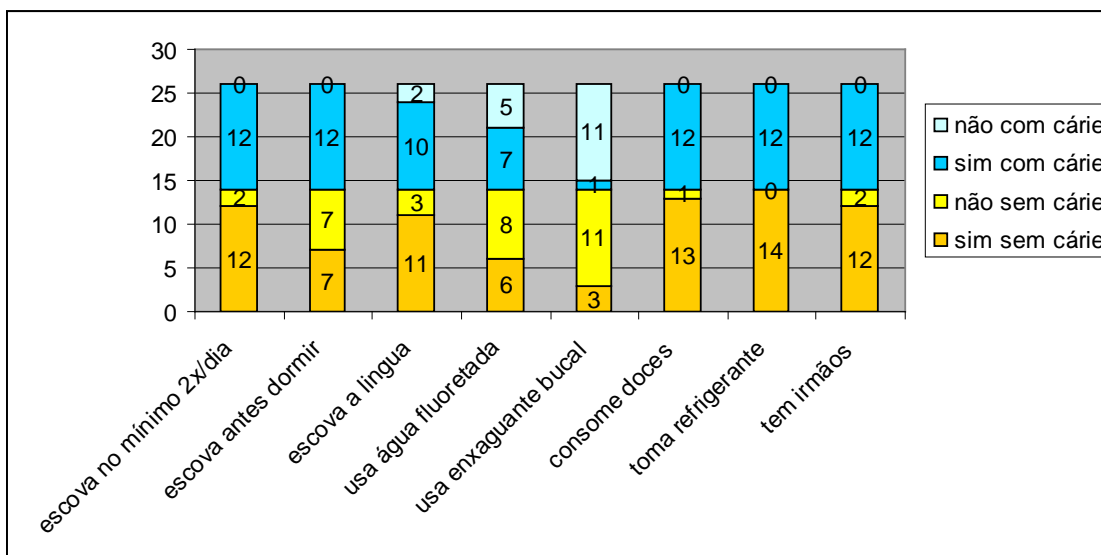


Figura 03. Parâmetros avaliados pelo questionário sobre hábitos diários dos indivíduos do estudo. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste exato de Fisher, considerando-se $p < 0,05$.

Analisando-se a tabela 01 e figura 03, pode se observar que não houve, entre as crianças com e sem cárie, diferença significativa com relação ao número de escovações diárias, escovação da língua, uso de água fluoretada, consumo de doces e refrigerantes ou presença de irmãos. No entanto, o número de crianças que relataram escovar os dentes antes de dormir foi significativamente maior no grupo com cárie ($p = 0,006$), um resultado contrário ao esperado.

Tabela 1. Respostas ao questionário pessoal (enviado aos pais).

Item da Pesquisa	Sem cárie - 14				Com cárie - 12			
	Sim		Não		Sim		Não	
Parâmetros de correlação negativa com a cárie								
Escovação no mínimo 2x/dia	12	85,7%	2	14,3%	12	100%	0	0,00%
Escovação antes de dormir*	<u>7</u>	50%	<u>7</u>	50%	<u>12</u>	100%	<u>0</u>	0,00%
Escovação de língua	11	78,6%	3	21,4%	10	83,3%	2	16,7%
Uso de água fluoretada	6	42,86%	8	57,14%	7	58,3%	5	41,7%
Uso de enxaguante bucal	3	21,4%	11	78,6%	1	8,3%	11	91,7%
Parâmetros de correlação positiva com a cárie	Sem cárie - 14				Com cárie - 12			
	Sim		Não		Sim		Não	
Consumo de doces	13	92,8%	1	7,2%	12	100%	0	0,00%
Consumo de refrigerante	14	100%	0	0%	12	100%	0	0,00%
Tem irmãos	12	85,7%	2	14,3%	12	100%	0	0,00%

*p< 0,05, na comparação entre indivíduos com e sem cárie.

No momento da coleta das amostras de saliva, foi realizado o exame clínico da cavidade oral dos voluntários, e os resultados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Avaliação clínica da cavidade oral dos participantes do estudo

Item avaliado	Crianças sem Cárie – 14				Crianças com Cárie –12			
	Sim		Não		Sim		Não	
Respiração bucal	1	7,2%	13	93,8%	1	3,85%	11	42,31%
Boa higiene bucal*	<u>12</u>	<u>85,7%</u>	<u>2</u>	<u>14,3%</u>	<u>5</u>	<u>41,7%</u>	<u>7</u>	<u>58,3%</u>
Cárie a tratar*	0	0%	14	100%	7	58,3%	5	41,7%
Dentes restaurados**	0	0%	14	100%	11	91,7%	1	8,3%
Dentes extraídos	0	0%	14	100%	3	25%	9	75%

* $p < 0,05$, na comparação entre indivíduos com e sem cárie

** $p < 0,001$, na comparação entre indivíduos com e sem cárie.

Analisando-se a tabela 2, é possível observar uma correlação entre má higiene bucal e presença de lesões cariosas ($p = 0,037$). Também, no grupo com cárie observa-se a perda de dentes em decorrência do agravamento das lesões, bem como a presença de novas lesões cariosas ($p = 0,002$). A presença de respiração bucal não apresentou correlação com o status de cárie.

4.2 Isolamento de *S. mutans* das amostras de saliva

A figura 04 mostra o cultivo das amostras de saliva em placas de petri contendo meio seletivo para *S. mutans*, Agar Mitis Salivarius. A análise das placas revelou uma grande variabilidade na morfologia e no número de unidades formadoras de colônia entre diferentes crianças. As setas indicam colônias sugestivas de *S. mutans*, de coloração azul, com aparência áspera, aderidas ao meio de cultura, envolvidas por uma gota de líquido brilhante. A colônia

selecionada de cada placa foi submetida à prova da catalase, garantindo assim maior seletividade para o cultivo em caldo BHI.

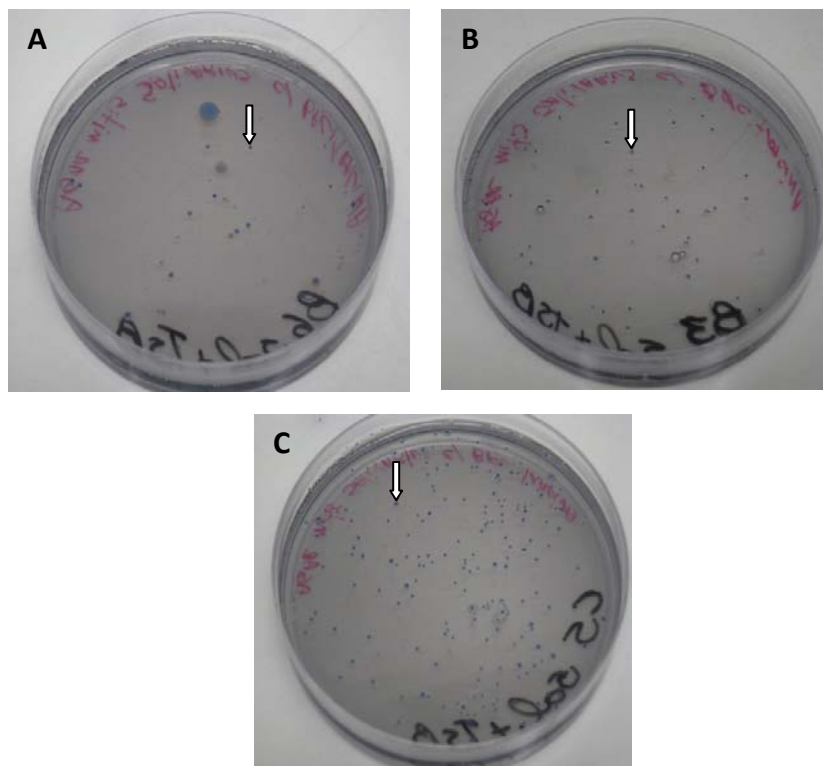


Figura 04. Cultivo em Agar mitis salivarius da saliva de crianças em idade escolar, com (A e B) ou sem (C) cárie. As setas indicam as colônias selecionadas para crescimento em BHI.

Mesmo entre as crianças com cárie, foi possível observar variabilidade no perfil das bactérias (Figura 4A e B). Na placa B6 (Figura 4A) observou-se o crescimento de colônias bem maiores que o *S. mutans*, com aspecto de uma massa cremosa, não aderida ao gel, catalase positivas. Já a placa B3 (Figura 4B) apresentou predomínio do crescimento de colônias com características de *mutans*. Por essa razão, esta placa foi selecionada para a coleta da amostra com a qual foi realizado o crescimento para amplificação gênica de *brpA*.

Na placa C5 (Figura 4C) observou-se o crescimento de colônias menores e com aparência mais suave, opaca e não se apresentaram aderidas ao Agar, um aspecto sugestivo de

Streptococcus sobrinus (Smith, 2000), embora não seja possível afirmar, com base apenas na morfologia da colônia, tratar-se desta espécie de bactéria.

Embora seja possível verificar algumas diferenças na morfologia das colônias bacterianas, a coloração azul do meio dificulta uma identificação morfológica mais precisa. Também, devido à utilização de antibiótico e meio seletivo, as colônias obtidas não representam a microbiota do indivíduo; por essas razões, não foi realizada a contagem diferencial das colônias. De maneira geral, não houve correlação entre quantidade de bactérias na placa e a origem da saliva.

Após o isolamento, todas as amostras foram submetidas à coloração de gram, e apresentaram cultivos puros com morfologia sugestiva de *S. mutans*, conforme mostra a Figura 05.

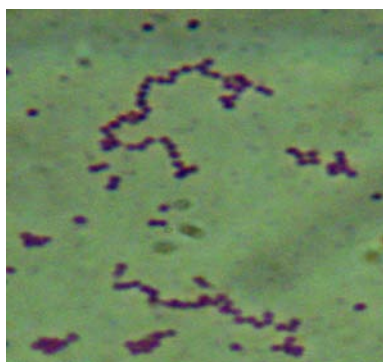


Figura 05. Coloração de Gram de um esfregaço de *Streptococcus mutans* isolado de saliva de criança com cárie em idade escolar e cultivado em meio BHI (isolado B3). O material foi analisado em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x).

4.3 Análise da formação de biofilme por *S. mutans*

Para avaliar a formação de biofilme pelas bactérias isoladas da saliva dos voluntários, foi utilizado um ensaio de adesão dependente de sacarose, através do cultivo das amostras em meio contendo sacarose por 24 horas, em microplaca. Embora a D.O.₆₀₀ dos cultivos tenha sido ajustada para 0,1 quando da passagem para meio contendo sacarose, houve diferenças no crescimento bacteriano após 24 horas, que variou de D.O.₆₀₀ 0,33 a 0,8. Assim, foi necessário

fazer a normalização dos cultivos, considerando o de maior D.O. como 100%, e calculando as porcentagens relativas dos demais cultivos.

As amostras foram então lavadas, fixadas e coradas com fucsina, e foi realizada nova leitura de absorvância, desta vez a 492nm. Os resultados desta leitura foram padronizados conforme a D.O. normalizada dos cultivos, dividindo-se o valor da D.O. pela porcentagem correspondente a cada cultivo. A figura 6 mostra as medianas de absorvância normalizadas, que correspondem à formação de biofilme pelas bactérias isoladas de crianças com e sem cárie. As bactérias isoladas dos voluntários com cárie apresentaram capacidade adesiva significativamente superior à do grupo sem cárie ($p=0,0177$)

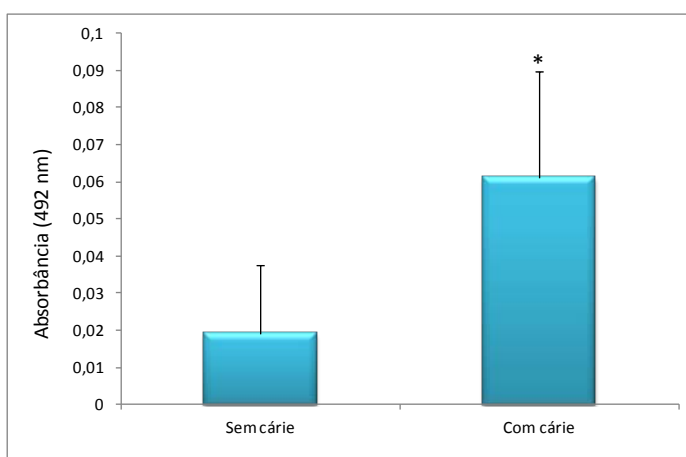


Figura 06. Formação de biofilme por *S. mutans* isolados de crianças com e sem cárie, em presença de sacarose (* $p=0,0177$).

4.4 Análise da presença do gene para mutacina IV em *S. mutans*

A presença do gene da mutacina IV nas bactérias isoladas da saliva de crianças com e sem cárie foi analisada por PCR, utilizando-se o gene *brpA* e um fragmento do gene *gtfB* como controles. A figura 07 mostra a análise por eletroforese dos DNAs amplificados por PCR.

O fragmento B de GtfB, inicialmente selecionado com controle positivo da reação, não foi obtido em nenhuma das condições avaliadas (concentrações de $MgCl_2$ de 1,5; 2,5 e 3,5mM, Tms

e temperatura de 50 a 58 °C) e não pôde ser utilizado como controle. Assim, o gene de *brpA* foi utilizado em substituição ao de *gtfB*.

A análise da PCR revelou a amplificação de fragmentos de tamanho esperado para o gene da mutacina IV (com 1344 pares de bases) em sete amostras, sendo quatro de indivíduos sem cárie (tabela 3 e figura 07, lanes 6, 8, 15 e 17) e três com cárie (tabela 3 e figura 07, lanes 10, 12 e 19). Não houve diferenças significativas entre as bactérias dos dois grupos.

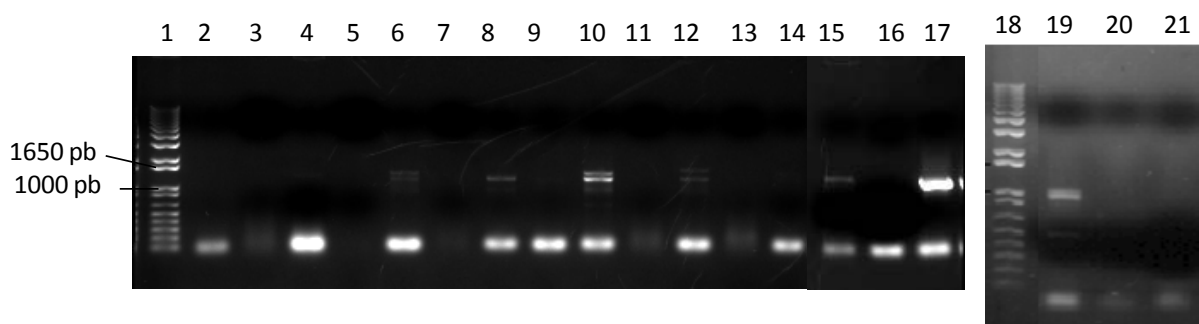


Figura 07. Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene da mutacina IV a partir de bactérias de indivíduos sem cárie (amostras 2 a 8 e 15 a 17) e com cárie (amostras 9 a 14 e 19 a 21). Nos dois géis, 1 e 18 correspondem ao padrão de peso molecular 1Kb Plus.

O gene *brpA* foi amplificado das mesmas amostras utilizadas para amplificação do gene da mutacina IV. A tabela 3 apresenta as amostras positivas para cada um dos dois genes, dentre as 19 bactérias analisadas.

Tabela 3. Amostras positivas para a presença dos genes *brpA* e mutacina IV.

Total de amostras amplificadas = 19				
Amostras positivas <i>brpA</i>	Amostras positivas para mutacina IV	Amostras positivas para <i>brpA</i> e mutacina IV	Amostras positivas para <i>brpA</i> e negativas para mutacina IV	Amostras negativas para <i>brpA</i> e positivas para mutacina IV
10	7	4	4	2

Analisando-se a tabela, é possível observar que o gene de *brpA* foi amplificado de cerca de 50% das bactérias. Em duas amostras, foi possível amplificar mutacina IV, mas não *brpA*. Em conjunto, os dados sugerem que *brpA* não foi um bom controle positivo para esta reação.

4.5 Avaliação do potencial aglutinante das amostras de saliva

O potencial aglutinante das salivas foi avaliado através da incubação das amostras em presença de *S. mutans*, e comparação da densidade ótica das mesmas nos tempos 0 e após 1 hora de incubação. Os resultados, apresentados na figura 8 mostram a redução da densidade ótica após a incubação, reflexo da aglutinação das bactérias. É possível observar, nas amostras de saliva das crianças sem cárie, uma redução de cerca de 20% na densidade ótica um valor significativamente maior ao obtido pelas amostras de saliva das crianças com cárie. Estes resultados sugerem que a saliva das crianças sem cárie apresenta maior potencial aglutinante sobre *S. mutans*, em comparação à das crianças com cárie.

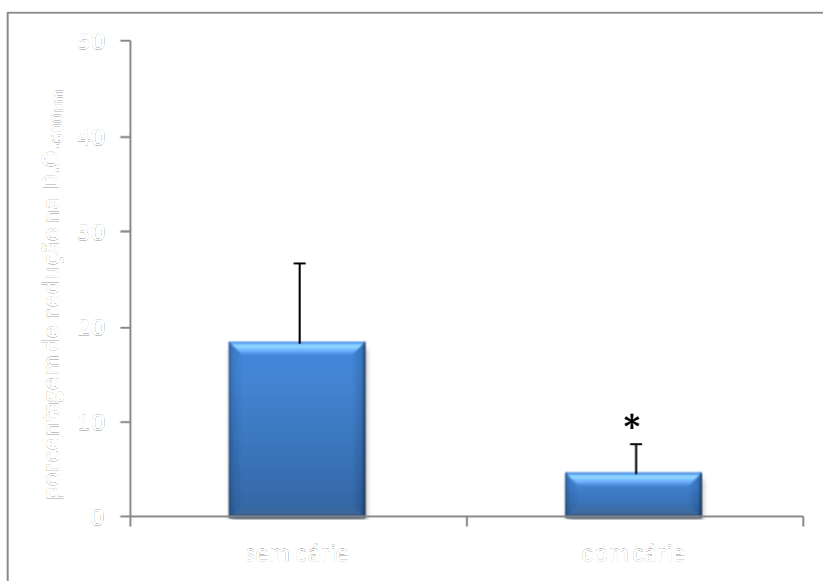


Figura 08. Avaliação do efeito aglutinante das amostras de saliva sobre *S. mutans*. O resultado foi expresso em porcentagem de redução da absorbância a 600 nm (*p=0,0059).

4.6 Clonagem do gene *brpA* em vetor de expressão em procariotos

A Figura 09 mostra a eletroforese em gel de agarose do gene *brpA* amplificado por PCR a partir do DNA cromossômico de *S. mutans* isolado da saliva. A seta indica o gene *brpA*, com 1221 pares de bases.

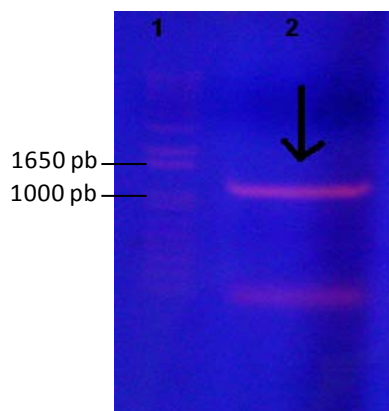


Figura 09. Eletroforese em gel de agarose do gene *brpA* amplificado por PCR. 1. Padrão de corrida para DNA, 1Kb plus, 2. O gene *brpA* indicado pela seta.

A banda correspondente ao gene foi cortada, purificada e ligada ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega). O produto da ligação, pGEM-T Easy-*brpA*, transformou *E. coli* DH5- α , e após o isolamento de colônias em meio LB amp, foi realizada a extração dos vetores, com auxílio do kit Plasmid Prep (GE HealthCare).

Após a purificação, os vetores foram digeridos com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* a fim de separar o gene *brpA*, para que o mesmo pudesse ser ligado ao vetor de expressão pAE. A figura 10 mostra o produto da digestão enzimática dos vetores pGEM-T Easy-*brpA* com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*.

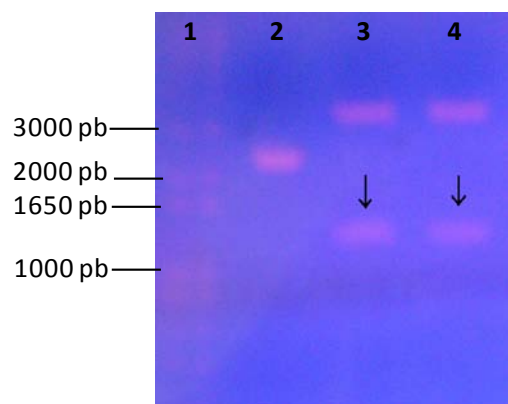


Figura 10. Eletroforese em gel da agarose dos produtos da digestão enzimática de pGEM-Teasy-*brpA*. 1. Padrão 1kb plus; 2. vetor fechado; 3. e 4. pGEM-Teasy-*brpA* digerido. A seta indica o gene *brpA*.

As bandas correspondentes ao gene *brpA* foram cortadas, purificadas e ligadas ao vetor pAE e digerido com as mesmas enzimas. O produto, pAE-*brpA*, foi inserido em *E. coli* DH5- α , e purificado dos cultivos bacterianos em meio LB amp líquido. A obtenção do DNA recombinante foi confirmada por seqüenciamento.

4.7 Produção da proteína BrpA

A proteína recombinante foi produzida de forma solúvel no citoplasma de *E. coli* BL21(DE3) transformada com a construção pAE-*brpA*, pela indução dos cultivos com IPTG. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺, pela eluição com Imidazol 400 mM. A presença da proteína nas frações da purificação foi analisada por SDS-PAGE, conforme mostra a figura 11.

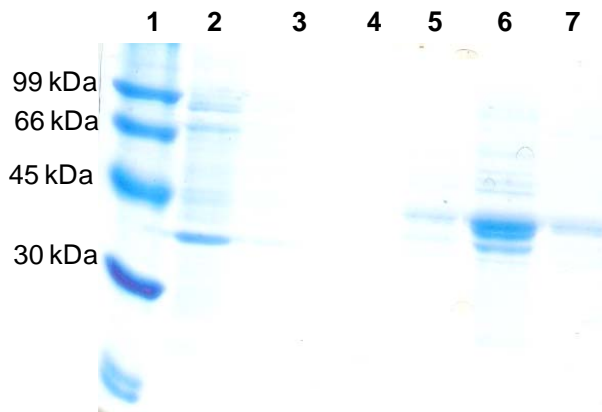


Figura 11. Análise da proteína BrpA purificada de *E. coli* BL21(DE3). A proteína foi purificada a partir do sobrenadante dos lisados bacterianos. 1. Padrão de peso molecular LMW (Sigma). 2. Flow-through. 3. Lavagem. 4 a 7. Frações eluídas.

A proteína BrpA recombinante, presente nas frações 5 a 7, foi dialisada contra tampão de equilíbrio e congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.8 Avaliação da resposta imune humoral em camundongos imunizados com BrpA

A figura 12 mostra a produção de anticorpos após a imunização de camundongos com três doses da proteína recombinante. Pode-se observar que BrpA foi bastante imunogênico, induzindo a produção de anticorpos da ordem de 20 a 30 mg/mL, contra uma média de 4,7 $\mu\text{g/mL}$, no grupo controle (figura 12). A tipagem dos anticorpos revelou a presença de elevadas concentrações de IgG1 e IgG2a, sem diferença estatística entre os dois isotipos.

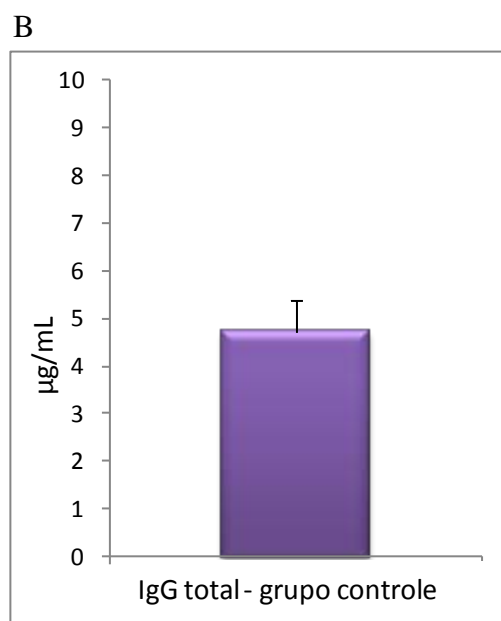
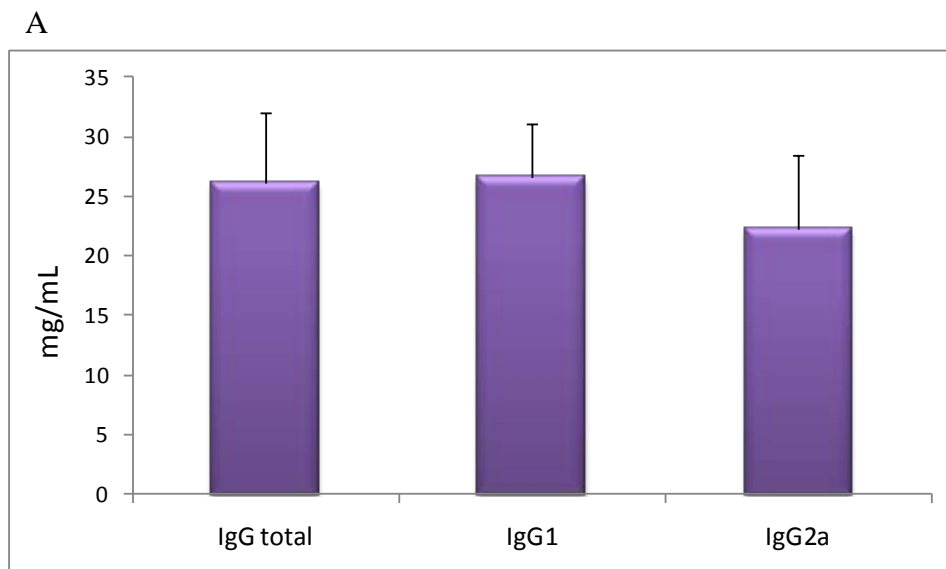


Figura 12. Análise da produção de IgG anti-BrpA em camundongos, por ELISA. As concentrações foram calculadas para os soros coletados após a terceira imunização com a proteína recombinante. A comparação entre os grupos foi feita através do teste t de Student, considerando-se $p < 0,05$. A. Soro de animais imunizados com BrpA; B. soro de animais controle, injetados com Alum.

5. DISCUSSÃO

A susceptibilidade à cárie depende de uma série de fatores como a dieta e a higiene oral, além de fatores intrínsecos do hospedeiro e do *S. mutans*. Saarela *et al.* (1996), sugeriu que alguns isolados de *S. mutans* são mais cariogênicos do que outros, uma vez que a simples presença de grandes quantidades desta bactéria na saliva não pode ser correlacionada com a presença de lesões cariosas. Assim, o presente trabalho buscou traçar um perfil de susceptibilidade à carie em crianças em idade escolar, com base na análise de componentes da saliva e de *Streptococcus mutans*.

Inicialmente, foi avaliada a correlação entre fatores relacionados à higiene bucal e hábitos alimentares com o status de cárie, por meio de questionário associado à avaliação clínica dos voluntários do estudo.

No questionário de hábitos diários, foi observada uma correlação positiva entre o hábito de escovação noturna e a presença de cárie, um resultado contrário ao esperado, uma vez que o tempo de permanência de resíduos alimentares na cavidade oral está relacionado a um maior risco de desenvolvimento de lesões cariosas (van Houte *et al.*, 1982; Mattos-Graner *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2007). No entanto, durante a análise clínica da cavidade oral dos voluntários, o parâmetro higiene bucal apresentou diferença significativa entre as crianças com e sem cárie, sugerindo que a qualidade da escovação teve forte influência sobre o desenvolvimento de lesões cariosas nas crianças deste estudo. A remoção mecânica ou desestruturação do biofilme formado está diretamente associada à diminuição da doença cárie. Conseqüentemente, indivíduos com melhor higiene não possuem ou possuem um índice menor de cárie (Fadel & Kozlowski Junior, 1999). Também, a verificação de dentes extraídos em crianças com cárie sugere o aumento na gravidade das lesões, possivelmente ocasionado pela ausência de higiene oral adequada.

Em nosso trabalho, as crianças selecionadas foram de escolas públicas, possuíam um nível social semelhante e apresentavam uma idade onde a fase de dentição é mista (presença de dentes decíduos e dentes permanentes). Nesta faixa etária, a escovação dos dentes já é independente da ajuda dos pais pois estas crianças já apresentam uma coordenação motora que lhes permite tal procedimento. Observamos maior índice de cárie em crianças com piores condições de higiene bucal. Tal fato não foi relacionado a uma menor idade dos participantes.

A fim de se estudar a contribuição de fatores bacterianos para o desenvolvimento da cárie em crianças, foi realizado o isolamento de *Streptococcus mutans* a partir das amostras de saliva

coletadas. Todas as amostras de saliva analisadas apresentaram colônias com morfologia sugestiva de *S. mutans*, indicando um alto índice de infecção por este microrganismo entre crianças em idade escolar. No entanto, como o meio Ágar Mitis *Salivarius* permite o crescimento de outras bactérias do grupo *mutans*, em especial *Streptococcus sobrinus*, a confirmação da presença de *S. mutans* deve ser realizada através de testes bioquímicos ou por PCR (Salazar, 2008; Loesche, 1986). O *S. sobrinus* apresenta características morfológicas e de virulência semelhantes ao *S. mutans*, embora os mecanismos moleculares envolvidos nesta virulência possam ser bem distintos. O *S. sobrinus* também fermenta grande quantidade de açúcares, mas nem todos os fermentados pelo *S. mutans*, como por exemplo, a rafinose, a melobiose, o sorbitol. Outra diferença, é que sua alta tolerância aos ácidos não parece ser decorrente da atividade da bomba translocadora de prótons, como ocorre com os *S. mutans*, e sim do aumento da atividade de outros sistemas (Nascimento *et al.*, 2004). *S. sobrinus* também está envolvido no desenvolvimento de cárie. Foi demonstrado que associações entre *S. mutans* e *S. sobrinus* podem estar presentes em lesões cariosas (Hamada & Slade, 1980; Coykendall, 1989; Law *et al.*, 2007). No entanto, a prevalência de *S. sobrinus* na cavidade oral é muito menor do que a de *S. mutans* (Loesche, 1986). Okada *et al.* (2005), em estudo de um ano com 60 pré-escolares (3 a 5 anos de idade) compararam a incidência de cárie com a colonização por *Streptococcus* do grupo *mutans*. A prevalência de *S. mutans* e *S. sobrinus* encontrada foi de 61,7% e 56,6%, respectivamente. Treze (21,7%) crianças apresentavam apenas *S. mutans*, dez (16,6%) crianças, apenas o *S. sobrinus* e vinte e quatro (40,0%) eram colonizadas por ambas as espécies. Em treze crianças não foi possível a detecção de *S. mutans*. Crianças colonizadas por *S. mutans* e *S. sobrinus* tinham maiores índices de prevalência de cárie em relação as colonizadas apenas por *S. mutans*. Embora as razões da dominância de *S. mutans* sobre *S. sobrinus* na cavidade oral não sejam totalmente compreendidas, a reduzida prevalência deste último sugere que a maior parte das bactérias do grupo *mitis* isoladas a partir de técnicas de cultivo específicas para o gênero *Streptococcus* serão *S. mutans*.

Outra maneira de diferenciar *S. mutans* de *S. sobrinus* é através da técnica de PCR (Loesche, 1986). Napimoga *et al.* (2004), utilizaram um fragmento do gene da glicosiltransferase B para identificar *S. mutans* isolados de amostras de saliva. O mesmo gene e uma técnica de PCR semelhante foram utilizados no presente trabalho, porém não foi possível amplificar o fragmento esperado em nenhuma das condições avaliadas. Assim, o gene de *brpA* foi selecionado e sua

sequência nucleotídica foi utilizada em análises de alinhamento por Blast (NCBI) contra os genomas de *S. mutans* e *S. sobrinus*, a fim de se avaliar o grau de identidade de sequência. Conforme esperado, embora tenha sido encontrada alta identidade com ORFs de *S. mutans*, não foi encontrado nenhum fragmento de DNA com homologia de sequência no genoma de *S. sobrinus*, indicando que *brpA* poderia ser utilizado na segregação entre estas duas espécies bacterianas. A análise dos fragmentos amplificados por PCR a partir do DNA genômico das amostras bacterianas mostrou a presença do gene *brpA* em 10 das 19 amostras, confirmando que estas contêm *S. mutans*. No entanto, como não há dados sobre a prevalência do gene *brpA* nos isolados de *S. mutans*, não é possível afirmar que as demais amostras não sejam *S. mutans*. Uma amplificação posterior utilizando outra região do gene da glicosiltransferase deverá confirmar a identidade dos isolados que não foram identificados.

Estudos de Köhler e seus colaboradores (1984) mostraram que crianças que foram colonizadas pelo *S. mutans* antes dos dois anos de idade apresentaram uma prevalência maior de cárie em relação às que foram colonizadas depois dos dois anos. O mesmo grupo de crianças, aos sete anos, que foram colonizadas após os dois anos, possuía níveis baixos de *S. mutans* e significativo baixo índice de cárie em relação às que foram colonizadas mais cedo. Estes dados ressaltam a importância da idade de exposição ao *S. mutans*, e confirmam a elevada prevalência da bactéria mesmo entre crianças sem cárie.

A correlação entre potencial cariogênico e expressão aumentada de certos fatores de virulência bacterianos já foi sugerida em diversos estudos (Qi *et al.*, 2001; Kamyia *et al.*, 2005). Foi verificada uma correlação positiva entre o nível de síntese de glucanos insolúveis em água e frequência de células aderentes na presença de sacarose em indivíduos com cáries, mas não em indivíduos sem cárie (Napimoga *et al.*, 2005). Também foi verificada uma associação entre a presença de certos genes e o potencial cariogênico. Em trabalho de Kamiya *et al.* (2005), analisando a presença de mutacinas em amostras de saliva, foi observada uma maior quantidade de isolados de *S. mutans* positivos para o gene da mutacina IV em adultos com cárie, em comparação com o grupo sem cárie. No presente estudo, no entanto, não foram observadas diferenças na presença deste gene entre as crianças com e sem cárie. Este contraste pode ser devido à variabilidade no grupo de voluntários participantes dos estudos (Kamiya e seus colaboradores trabalharam com a saliva de adultos, enquanto este trabalho coletou amostras de crianças).

Ao contrário da maioria das doenças infecciosas, em que os fatores de virulência clássicos, como toxinas, desempenham um papel importante no dano provocado pelo microrganismo, a patologia da cárie dentária está associada quase exclusivamente ao metabolismo bacteriano. O catabolismo dos nutrientes na saliva e da dieta do hospedeiro criam estressores na forma de ácidos, espécies reativas de oxigênio, e outros agentes que causam danos a biomoléculas. Assim, tolerância ao estresse, pelo *S. mutans*, está intimamente ligada à virulência (Lemos *et al.*, 2008).

Neste contexto, um dos mecanismos mais importantes – e também mais difundidos entre microrganismos orais – de tolerância ao estresse é a formação de biofilmes. Por esta razão, diversos grupos têm analisado as diferenças na capacidade de formar biofilme como correlatos de virulência em *S. mutans*, utilizando metodologias distintas e com resultados conflitantes (Wen & Burne, 2002; Nakano *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2006). No presente trabalho, foi comparado o potencial de formação de biofilme entre *S. mutans* isolados da cavidade de crianças com e sem cárie, utilizando-se um ensaio de adesão dependente de sacarose em placa. Foi observada uma maior capacidade adesiva das bactérias isoladas de crianças com cárie, em relação ao grupo sem cárie. Este resultado sugere uma correlação positiva entre capacidade adesiva e potencial cariogênico.

Diversos estudos têm relatado a contribuição de fatores da saliva na inibição da cárie, incluindo enzimas salivares como a lisozima, a peroxidase salivar e a lactoferrina, imunoglobulinas, como IgA secretora, IgG e IgM, e potencial aglutinante (Kirstilä *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2001). No presente trabalho, foi analisado o potencial aglutinante das salivas sobre *S. mutans*. As salivas das crianças sem cárie apresentaram capacidade de aglutinar *S. mutans* significativamente superior às dos indivíduos com cárie. Este resultado já foi observado por outros estudos (Kirstilä *et al.*, 1998) e sugere influência da capacidade aglutinante da saliva sobre a prevalência de cárie. Em conjunto, a análise dos diferentes fatores bacterianos e do hospedeiro sugere que tanto o potencial da bactéria para formar biofilme, quanto a capacidade da saliva em bloquear seu estabelecimento correlacionam-se com a presença de lesões cariosas em crianças.

A proteína BrpA foi identificada pela análise do genoma de *S. mutans*, e apresenta homologia com reguladores transcricionais de outros cocos gram-positivos (Wen & Burne, 2002). Sua estrutura e localização sugere estar associada ao envelope celular bacteriano, fazendo desta proteína um candidato vacinal potencial contra *S. mutans*. Estudos com bactérias BrpA

negativas demonstram que esta proteína é essencial para a formação eficiente de biofilmes (Wen & Burne, 2002; Nakano *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2006), um mecanismo necessário para a sobrevivência desta bactéria na cavidade oral, e consequentemente associado com uma maior virulência. Com base nestes dados, o presente projeto propôs a investigação da acessibilidade da proteína BrpA a anticorpos na superfície de *S. mutans*, uma característica desejável em potenciais candidatos vacinais. Para tanto, o gene *brpA* foi clonado em vetor de expressão e teve sua expressão induzida em *E coli BL21(DE3)*, a proteína produzida foi utilizada na imunização sistêmica de camundongos. BrpA apresentou elevada imunogenicidade neste modelo, induzindo a produção de níveis de anticorpos da ordem de miligramas. Em conjuntos os dados sugerem que BrpA é um candidato vacinal interessante contra *S. mutans*, e novos ensaios de análise funcional destes anticorpos (capacidade de ligação à superfície bacteriana, potencial opsonizante) deverão ser realizados para confirmar os dados aqui apresentados.

6. CONCLUSÃO

- O exame clínico da cavidade oral dos voluntários revelou forte correlação entre má higiene bucal e a presença de lesões cariosas, não tendo sido observada correlação com os demais fatores avaliados;
- A prevalência do gene para mutacina IV foi a mesma entre os grupos com e sem cárie;
- O potencial aglutinante das salivas das crianças sem cárie apresentaram capacidade aglutinante sobre *S. mutans* significativamente superior à do grupo com cárie;
- As bactérias isoladas do grupo com cárie apresentaram capacidade de adesão significativamente superior às do grupo sem cárie;
- Em conjunto, dentre os diversos fatores bacterianos e do hospedeiro analisados, a capacidade de formar biofilme e o potencial aglutinante da saliva apresentaram correlação com o desenvolvimento de cáries;
- A proteína recombinante BrpA produzida em *E. coli* mostrou-se bastante imunogênica em camundongos;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aduse-Opoku, J.; Gilpin, M. L.; Russell, R. R. Genetic and antigenic comparison of *Streptococcus mutans* fructosyltransferase and glucan binding protein. **FEMS Microbiol Lett**, 50: 279-282, 1989.

Ajdic, D.; Mcshan, W. M.; McLaughlin, R. E.; Savic, G.; Chang, J.; Carson, M. B.; Primeaux, C.; Tian, R.; Kenton, S.; Jia, H.; Lin, S.; Qian, Y.; Li, S.; Zhu, H.; Najjar, F.; Lai, H.; White, J.; Roe, B. A.; Ferretti, J. J. Genome Sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99 (22): 14434-14439, 2002.

Alaluwsua, S.; Kleemola-Kiyala, E.; Nyström, M.; Evälahti, M.; Grönroos, L. Caries in the primary teeth and salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels as indicators of caries in permanent teeth. **Pediatr Dent**, 9: 126-130, 1987.

Alaluwsua, S.; Mättö, J.; Grönroos, L. *et al.* Oral colonization by more than one clonal type of mutants *Streptococcus* in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol**, 41: 167-173, 1996.

Ambatipudi, K. S.; Hagen, F. K.; Delahunty, C. M.; Han, X.; Shafi, R.; Hryhorenko, J.; Gregoire, S.; Marquis, R. E.; Melvin, J. E.; Koo, H.; Yates, J. R. 3rd. Human common salivary protein 1 (CSP-1) promotes binding of *Streptococcus mutans* to experimental salivary pellicle and glucans formed on hydroxyapatite surface. **J Proteome Res**, 9: 6605-6614, 2010.

Aoki, H.; Shiroza, T.; Hayakawa, M.; Sato, S.; Kuramitsu, H.K. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infect Immun**, 53: 587-594, 1986.

Banas, J. A.; Vickerman, M. M. Glucan-binding proteins of the oral *streptococci*. **Crit Ver Oral Biol Med**, 14: 89-99, 2003.

Banu, L. D.; Conrads, G.; Rehrauer Hubert; Hussain, H.; Allan, E.; van der Ploeg, J. R. The *Streptococcus mutans* serine/threonine, Kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production and cell wall metabolism. **Infect Immun**, 78 (5): 2209-2220, 2010.

Bayona-González, A.; Lopez-Cámara, V.; Gomes-Castellanos, A. Prevención de la caries por *Lactobacilos* (resultados finales de un ensayo clínico sobre caries dental con *Lactobacilos* muertos-*Streptococcus* e *Lactobacilos* – por vía oral). **Práctica Odontológica, México**, 11 (7): 37-49, 43-46, 1990.

Beighton, D.; Rippon, H. R.; Thomas, H. E. C. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5 to 8 year-old Hampshire schoolchildren. **J Br Dent**, 162: 103-106, 1987.

Bensing, B. A.; Siboo, I. R.; Sullam, P. M. Proteins Ph1 and Pb1B of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. **Infect Immun**, 69: 6186-6192, 2001.

Biswas, S.; Biswas, I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 73 (10): 6923-6934, 2005.

Biswas, I.; Drake, L.; Erkina, D.; Biswas, S. Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol**, 190, 1: 68-77, 2008.

Bowen, W. H.; Schilling, K.; Giertsen, E.; Pearson, S.; Lee, S. F.; Bleiweis, A.; Beaman, D. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. **Infect Immun**, 59: 4606-4609, 1991.

Bowen, W. H.; Koo, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, 45: 69-86, 2011.

Projeto SB Brasil 2003, Brasil, Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Condições de Saúde Bucal da População Brasileira, 2002-2003, Resultados Principais. **Brasília-Ministério da Saúde**, 2003.

Burne, R. A.; Penders, J. E. Characterization of the *Streptococcus mutans* GS-5 *fruA* gene encoding exo-beta-D-fructosidase. **Infect Immun**, 60: 4621-4632, 1992.

Burne, R. A. Oral *streptococci*: products of their environment. **J Dent Res**, 77: 445-452, 1998.

Carlsson, J.; Kujala, V.; Edlund, M. B. Pyruvate dehydrogenase activity in *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 3: 674-678, 1985.

Caufield, P.W.; Cutter, G. R.; Dasanayake, A. P. Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete Window of Infectivity. **J Dent Res**, 72: 37-45, 1993.

Chatfield, C. H.; Koo, H.; Quivey Junior, R. G. The putative autolysin regulator LytR in *Streptococcus mutans* plays a role in cell division and is growth-phase regulated. **Microbiol**, 151: 625-631, 2005.

Chaudhuri, B.; Rojek, J.; Vickerman, M.M.; Tanzer, J.M.; Scannapieco, F.A. Interaction of salivary alpha-amylase and amylase-binding-protein A (AbpA) of *Streptococcus gordonii* with glucosyltransferase of *S. gordonii* and *Streptococcus mutans*. **BMC Microbiol**, 7: 60-72, 2007.

Childers, N. K.; Zhang, S. S.; Michalek, S. M. Oral Immunization of humans with dehydrated liposomes containing *Streptococcus mutans* glycosyltransferase induces salivary immunoglobulin A2 antibody response. **Oral Microbiol Immun, Copenhagen**, 9 (3): 146-153, 1994.

Colby, S. M.; Russell, R. R. Sugar metabolism by *mutans streptococci*. **Soc App1 Bacteriol Symp Ser**, 26: 805-885, 1997.

Coykendall, A. L. Classification and identification of the *viridans streptococci*. **Clin Microbiol Rev**, 3: 315-328, 1989.

Crowley, P. J.; Brady L. J.; Piacentini, D. A.; Bleiweis, A. S. Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 61: 1547-1552, 1993.

Cury, J. A. Controle químico da placa dental. **ABOPREV - Promoção de Saúde Bucal** p. 131-140, 1999.

Douglas, C. W. The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of *streptococcal* bacteria. **Arch Oral Biol**, 28: 567-573, 1983.

Douglas, C. W.; Russell, R. R. B. The adsorption of human salivary components to strains of bacterium *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, 29: 751-757, 1984.

Drucker, D. B.; Melville, T. H. Computer classification of *streptococci* mostly of oral origin. **Nature**, 221: 664, 1969.

Emanuelsson, I. R.; Thorquist, E. Genotypes of *mutans streptococci* tend to persist in their host for several years. **Caries Res**, 34: 133-139, 2000.

Emilson, C. G.; Carlsson, P.; Bratthall, D. Strains of *mutans streptococci* isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model. **Oral Microbiol Immun**, 2: 183-186, 1987.

Fadel, C. B.; Kozlowsk Júnior, V. A. Dieta e higienização bucal como preditores da cárie dental na primeira infância. **UFES Rev Odontol**, 1 (2): 66-77, 1999.

Ferretti, J. J.; Russell, R. R.; Dão, M. L. Sequence analysis of the wall-associated protein precursor of *Streptococcus mutans* antigen. **A Mol Microbiol**, 3: 469-478, 1989.

Flemming, H. C.; Wingender, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, 8: 623-633, 2010.

Freire, M. C. M.; Pereira, M. F.; Batista, S. M. O.; Borges M. R. S.; Barbosa, M. I.; Rosa, A.G. F. Prevalência de cárie e necessidade de tratamento em escolares de 6 a 12 anos da rede pública de ensino. **Revista de Saúde Pública**, 33: 385-390, 1999.

Freysleben, G. R.; Peres, M. A. A.; Marcenes, W. Prevalência de cárie e CPO-D médio em escolares de doze a treze anos de idade nos anos de 1971 a 1997-Região Sul-Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 34: 304-308, 2000.

Froeliger, F. H.; Fives-Taylor, P. *Streptococcus parasanguis* fimbria-associated adhesin Fap 1 is required for biofilm formation. **Infect Immun**, 69: 2512-2519, 2001.

Fukushima, K.; Ikeda, T.; Kuramitsu, H. K. Expression of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase genes in *Streptococcus milleri*. **Infect Immun**, 60: 2815-2822, 1992.

Gombôs, F.; Serpico, R.; Gaeta, G. M. Immunoprofilassi nella malattia cariosa. Cenni storici, dislocazione dei gruppi di ricerca, attuali possibilità sull'utilizzodi un vacino anticárie. **Archivio Stomatologico, Nápoles**, 30, 4: 663-684, 1989.

Gottesman, S.; Wickner, S.; Maurizi, M. R. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. **Genes Dev**, 11: 815-823, 1997.

Grönroos, L.; Alaluusua, S. Site-specific oral colonization of *mutans streptococci* detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res**, 34 (6): 474-480, 1998.

Grönroos, L. Quantitative and qualitative Characterization of *mutans streptococci* in saliva and in the dentition, 80f. **Dissertação acadêmica. Department of Pedodontics and orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, 2000.**

Hajishengallis, G.; Nicolova, E.; Russell, M. W. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (S-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: Reversal by IGA I protease cleavage. **Infect Immun**, 60, 12: 5057-5064, 1992.

Hamada, S.; Torii, M. Effect of sucrose in cultura media on the location of glycosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. **Infect Immun**, 20: 592-599, 1978.

Hamada, S.; Slade, H. D. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 44: 331-384, 1980.

Hamada, S.; Horikoshi, T.; Minami, T.; Kawabata, S.; Hiraoka, J.; Fujiwara, T.; Ooshima, T. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 59: 4161-4167, 1991.

Han, T. K.; Zhang, C.; Dao, M. L. Identification and characterization of collagen-binding activity in *Streptococcus mutans* wall-associated protein: a possible implication in dental root caries and endocarditis. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 343 (3): 787-792, 2006.

Hanada, N.; Kuramitsu, H. K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans GtfD* gene, coding for a primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infect Immun**, 57: 2079-2085, 1989.

Hilman, J. D.; Brooks, T. A.; Mickaleck, S. M.; Harmon, C. C.; Snoep, J. L.; van Der Weijden, C. C. Construction and characterization of an effector strain of *S. mutans* for replacement therapy of dental caries. **Infect Immun**, 68 (2): 543-549, 2000.

Honda, O.; Kato, C; Kuramitsu, H. K. Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. **J Gen Microbiol**, 136: 2099-2105, 1990.

Igarashi, T.; Yamamoto A.; Goto, N. Characterization of an exobeta-D-fructosidase from *Streptococcus mutans* Ingbritt. **Microbiol Immun**, 36: 643-647, 1992.

Igarashi, T.; Yamamoto, A.; Goto, N. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* Ingbritt *dex A* gene encoding extracellular dextranase. **Microbiol Immun**, 39: 853-860, 1995.

Imfeld, T.; Lutz, F Intraplaque acid formation assessed *in vivo* in children and young adults. **Pediatr Dent**, 2: 87-93, 1980.

Islam, B.; Khan, A. V. Dental caries: from infection to prevention. **Med Sci Monit**, 13 (11): 196-203, 2007.

Iwaami, Y.; Takahashi-Abbe, S.; Takahashi, N. The time- course of excretion, levels of fluorescence dependent on cellular nicotinamide adenine nucleotide and glycolytic intermediates of *Streptococcus mutans* cells exposed and not exposed to air in the presence of glucose and sorbitol. **Oral Microbiol Immun** 16: 34-39, 2001.

Jenkinson, H. F.; Demuth, D. R. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. **Mol Microbiol**, 23: 183-190, 1997.

Jensen, M. E.; Wefel, J. S. Human Dental plaque responses to meals and the effects of chewing gum. **Br Dent J**, 167: 204-208, 1989.

Jespersgaard, C.; Hajishengallis, G.; Grenway, T. E.; Smith, D. J.; Russell, M.W.; Michaleck, S. M. Functional and Immunogenese Characterization of two cloned regions of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase I. **Infect Immun**, 810-816, 1999.

Kamiya, R. U.; Napimoga, M. H.; Hofling J. F.; Gonçalves, R. B. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free, and caries-active individuals. **J Med Microbiol**, 54: 599-604, 2005.

Katz, J.; Harmon, C. C.; Buckner, G. P.; Richardson, G. J.; Russell, M. W.; Michalek, S. M. Protective salivary immunoglobulin A responses against *Streptococcus mutans* infection after intranasal immunization with *S. mutans* antigen I/II coupled to the B sub-unit of cholera toxin. **Infect Immun**, 63: 3649-3658, 1993.

Kirstilä, V.; Häkkinen, P.; Jentsch, H.; Vilja, P.; Tenovuo, J. Longitudinal analysis of the association of human salivary antimicrobial agents with caries increment and cariogenic microorganisms: a two-year cohort study. **J Dent Res**, 77: 73-80, 1998.

Kleinberg, J. A. A mixed bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hipotesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, 13: 108-125, 2002.

Köhler, B.; Bratthall, D.; Kruse, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Arch Oral Biol**, 28: 225-231, 1984.

Köhler, B.; Lundberg, A. B.; Birkhed, D.; Papapanou, P. N. Longitudinal study of intrafamilial *mutans streptococci* ribotypes. **Eur J Oral Sci III**, 111 (5): 383-389, 2003.

Kolenbrander, P. E.; London, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol**, 175 (11): 3247-3252, 1993.

Kuramitsu, H. Virulence factors of *mutans streptococci* role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Biol Med**, 4: 159-176, 1993.

Lacerda, J. T. Prevalência e Severidade da Cárie Dental em grupos homogêneos, segundo indicadores sócio-econômicos no município de Florianópolis (SC). **UFSC**, 109 p. (dissertação), 1999.

Laskowska, E.; Kuczynska-Wisnik, D.; Skorko-Glonek, J.; Taylor, A. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. **Mol Microbiol**, 22: 555-571, 1996.

Law, V.; Seow, W. K.; Townsend, G. Factors influencing oral colonization of *mutans streptococci* in Young children. **Australian Dental Journal**, 52: 93-100, 2007.

Lehner, T.; Russell, M. W.; Caldwell, J.; Smith, R. Immunization with purified protein antigen from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. **Infect Immun**, 34: 407-415, 1981.

Lehner, T.; Ma, J. K.; Munro, G.; Walker, P.; Childerstone, A.; Todryk, S. T-cell and B-cell epitope mapping and construction of peptide vaccines. In: Molecular pathogenesis of periodontal disease. Genco, R. J.; Hamada, S.; Lehner, T. **ASM Press**, 279-292, 1994.

Lehner, T. Imunologia das doenças da boca. **SP Editora Santos**, 74-78, 1996.

Lemos, J. A.; Burne, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiol**, 154 (Pt 11): 3247-3255, 2008.

Li, Y.; Caufield, P. M. Arbitrarily primed chain reaction finger-printing for the genotypic identification of *mutans streptococci* from humans. **Oral Microbiol Immun**, 13: 17-22, 1998.

Li, Y. H.; Aspiras, M. B.; Lau, P. C. Y.; Lee, J. H.; Ellen, R. P.; Cvitkovič, D. G. A quorum sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. **J Bacteriol**, 184 (10): 2699-2708, 2002.

Li, F.; Mickaleck, S. M.; Dasanayake, A. P.; Li, Y.; Kirk, K.; Childers, N. K. Intranasal Immunization of humans with *Streptococcus mutans* antigens. **Oral Microbiol Immunol**, 18 (5): 271-277, 2003.

Loesche, W. J.; Socransky, S. S.; Gibbons, R. J. *Bacteroides oralis*, proposed new species isolated from the oral cavity of man. **J Bacteriol**, 88: 1329-1337, 1964.

Loesche, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, 50: 353-380, 1986.

Longo, P. L.; Mattos-Graner, K. O.; Mayer, M. P. A. Determination of mutacin activity and detection of *mutA* genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol Immunol**, 18: 144-149, 2003.

Ma, J. K. C.; Hunjan, M.; Smith, R.; Kelly, C.; Lehner, T. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 58: 3407-3414, 1990.

Ma, J. K. The caries vaccine: a growing prospect. **Dental Update, Londres**, 2 (9): 374-380, 1999.

Maltz, M. e Silva, B. B. Relação entre cárie, gengivite e fluorose e nível sócio-econômico em escolares. **Revista de Saúde Pública**, 35: 170-176, 2001.

Marsh, P. D. Dental Plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. **J Clin Periodontol**, 32: 07-15, 2005.

Matee, M. I.; Miks, F. H.; de Soet, J. S.; Maselle, S. Y.; Graaf, J.; Helderma, W. H. R. *Mutans streptococci* in caries-active and caries-free infants in Tanzânia. **Oral Microbiol Immun**, 8: 322-324, 1993.

Matsumura, M.; Izumi, T.; Matsumoto, M. *et al.* The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Immun**, 7: 213-215, 2003.

Mattos-Graner, R. O.; Zelante, F.; Line, R. C.; Mayer, M. P. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1,0 to 2,5 year-old Brazilian children. **Caries Res**, 32: 319- 323, 1998.

McCabe, R. M.; Donkersloot, J. A. Adherence of *Veillonella* species mediated by extracellular glucosyltransferase from *Streptococcus salivarius*. **Infect Immun**, 18: 726-734, 1987.

Merritt, J. F.; Qi, S. D.; Goodman, M. H.; Anderson, S.; Shi, W. Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 71: 1972-1979, 2003.

Miranda, J. L.; Andrade, E. S. S.; Souza, G. F. M.; Alves, R. D.; Almeida, D.; Pinto, L. P. Vacinação: uma opção preventiva contra a cárie dental aprimorada pelos conhecimentos da Imunologia e da Biotecnologia. **Rev Fac Odontol São José dos Campos**, 4 (1): 67-76, 2001.

Mormann, J. E.; Muhlemann, H. R. Oral starch degradation and its influence on acid production in human dental plaque. **Caries Res**, 15: 166-175, 1981.

- Murray, J. Prevalence of dental caries: retrospect and prospect. **Dent Update**, 9: 374-378, 1998.
- Nakai, M.; Okahashi, N.; Ohta, H.; Koga, T. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. **Infect Immun**, 61: 4330-4349, 1993.
- Nakano, K.; Matsumura, M.; Kawaguchi, M.; Fujiwara, T.; Sobue, S.; Nakagawa, I.; Hamada, S.; Ooshima, T. Attenuation of glucan-binding protein C reduces the cariogenicity of *Streptococcus mutans*: analysis of strains isolated from human blood. **J Dent Res**, 81: 376-379, 2002.
- Nakano, K.; Fujita, K.; Nishimura, K.; Nomura, R.; Ooshima, T. Contribution of biofilm regulatory protein A of *Streptococcus mutans*, to systemic virulence. **Microbes and Infection**, 7: 1246-1255, 2005.
- Nakano, K.; Ooshima, T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. **Future Microbiol**, 4: 891-902, 2009.
- Napimoga, M. H.; Kamiya, R. U.; Rosa, R. T.; Rosa, E. A. R.; Höfling, J. F.; Mattos-Graner, R. O.; Gonçalves, R. B. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. **J Med Microbiol**, 53: 697-703, 2004.
- Napimoga, M. H.; Kamiya, R. U.; Klein, M. I.; Höfling, J. F.; Gonçalves, R. B. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **J Oral Sci**, 47: 59-64: 2005.
- Nascimento, M. M.; Lemos, J. A.; Abranches, J.; Gonçalves, R. B.; Burne, R. A. Adaptive acid tolerance response of the *S. sobrinus*. **J Bacteriol**, 186: 6383-6390, 2004.
- Nyvad, B.; Kilian, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and caries-inactive individuals. **Caries Res**, 24: 267-272, 1990.

Oetjen, J.; Fives-Taylor, P.; Froeliger, E. Characterization of a *streptococcal* endopeptidase with homology to human endothelin-converting enzyme. **Infect Immun**, 69: 58-64, 2001.

Okada, M.; Soda, Y.; Hayashi, F.; Doi, T.; Suzuki, J.; Miura, K.; Kozai, K. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. **J Med Microbiol**, 54: 661-665, 2005.

Paes Leme, A. F.; Koo, H.; Bellato, C. M.; Bedi, G.; Cury, J. A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. **J Dent Res**, 85: 878-887, 2006.

Parrot, M.; Caufield, P. W.; Lavoie, M. C. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. **Can J Microbiol**, 36: 123-130, 1990.

Pinto, V. G. Epidemiologia das doenças bucais no Brasil. **ABOPREV – Promoção de Saúde Bucal, S.P.-Artes Médicas**, p. 29-41, 1999.

Qi, F.; Chen, P.; Caufield, P. W. Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol**, 65: 652-658, 1999a.

Qi, F.; Chen, P.; Caufield, P. W. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA 787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. **Appl Environ Microbiol**, 65: 3880-3887, 1999b.

Qi, F.; Chen, P. e Caufield, P.W. The Group I Strain of *Streptococcus mutans*, UA140, Produces Both the Lantibiotic Mutacin I and a Nonlantibiotic Bacteriocin, Mutacin IV. **Appl Environ Microbiol**, 67 (1): 15-21, 2001.

Ramos, C.R.R.; Abreu, P.A.E.; Nascimento, A.L.T.O.; Ho, P.L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, 37 (8): 1103-1109, 2004.

Rölla, G.; Ciardi, J. E.; Schultz, S. A. Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated by hydroxyapatite: possible mechanism for sucrose dependent bacterial colonization of teeth. **Scand J Dent Res**, 91: 112-117, 1983.

Rudney, J. D. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? **Crit Rev Oral Biol Med**, 6: 343-367, 1995.

Russell, M. W.; Bergmeier, L. A.; Zanders, E. D.; Lehner, T. Protein antigens of *Streptococcus mutans* purification and properties of a Double antigen and its protease-resistant component. **Infect Immun**, 28: 486-493, 1980.

Russell, R. R.; Donald, A. C.; Douglas C. W. Fructosyltransferase activity of a glucan binding protein from *Streptococcus mutans*. **J Gen Microbiol**, 129: 3243-3250, 1983.

Russell, R. R.; Abdulla, E.; Gilpin, M. L.; Smith, K. Characterization of *Streptococcus mutans* surface antigens. 61-70. In Hamada, S. Molecular biology and Immunology of *Streptococcus mutans*. **Elsevier, Amsterdam, the Netherlands**, 1986.

Russell, M. W.; Harrington, D. J.; Russell, R. D. B. Identity of *Streptococcus mutans* surface protein antigen III and wall-associated protein Antigen A. **Infect Immun**, 63: 733-735, 1995.

Russell, M. W.; Childers, N. K.; Michalek, S. M.; Smith, D. J.; Taubman, M. A. A Caries Vaccine? The State of the Science of Immunization against dental caries. **Caries Res**, 38: 230-235, 2006.

Saarela, M.; Hannula, J.; Mättö, J.; Asikainen, S.; Alaluusua, S. Typing of *mutans streptococci* by arbitrary primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol**, 41: 821-826, 1996.

Salazar, L. A.; Vásquez, C.; Almuna, A.; Oporto, G.; Santana, R.; Sanhueza, A. Detección molecular de *Streptococci* cariogênicos en saliva. **Int J Morphol**, 26 (4): 951-958, 2008.

Sambrook, J.; MacCallum, P.; Russell, D. The condensed protocols from molecular cloning. **A Laboratory Manual**, 2006.

Sato, Y.; Yamamoto, Y.; Kizaki, H. Cloning and sequence analysis of the gbpC gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 65: 668-675, 1997.

Shachtele, C. F.; Hailander, S. K. Will the diets of the future be less cariogenic? **J Can Dent Assoc**, 50: 213-219, 1984.

Shah, D. S.; Russell, R. R. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. **Microbiol**, 150: 1947-1956, 2004.

Shaw, J. H. Causes and control of dental caries. **N Engl J Med**, 317 (16): 996-1004, 1987.

Shen, S.; Samarnayake, L. P.; Yip, H. K. *In vitro* growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. **J Dent**, 37: 667-678, 2004.

Smith, D. J.; Taubman, M. A. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. **Infect Immun**, 64: 3069-3073, 1996.

Smith, D. J.; Heschel, R. L.; Melvin, J.; King, W. F.; Pereira, M. B. B.; Taubman, M. A. *Streptococcus mutans* glucan binding proteins as dental caries vaccines. In: Mucosal Solutions. **Advances In Mucosal Immunology**, v.2, **University of Sidney Press**, 367-377, 1997.

Smith, D. J. Water insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12-to-30 month-old children. **J Dent Res**, 79 (6): 1371-1377, 2000.

Smith, D. J. Dental Caries Vaccines: Prospects and Concerns. **Crit Rev Oral Biol Med**, 13 (4): 335-349, 2002.

Socransky, S. S.; Haffajee, A. D. Dental Biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology**, 28: 12-55, 2002.

Souza, G. F. M.; Andrade, E. S. S.; Miranda, J. L.; Alves, R. D.; Pinto, L. P.; Almeida, D. Abordagem Imunológica da cárie dentária. **PGR-Pós Grad Rev, Fac Odontol São José dos Campos**, 2: 28-34, 2001.

Stefenelli, N.; Klotz, H.; Engel, A.; Bauer, P. Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections and chronic liver diseases. **J Cancer Res Clin Oncol**, 109: 55-59, 1985.

Sthepan, R. M. Intra-oral hydrogen-ion concentration associated with dental caries activity. **J Dent Res**, 23: 257-266, 1944.

Taubman, M. A.; Smith, D. J. Microbiology of dental caries. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, 408-421, 2005.

Thibodeau, E. A.; Ford, C. M. Chain formation and de-chaining in *Streptococcus sobrinus* SL-1. **Oral Microbiol Immun**, 6: 313-315, 1991.

Thylstrup, A.; Fejerskov, O. *Cariologia Clínica*, 2ª Ed. **São Paulo: Santos**, 1995.

Vacca-Smith, A. M.; Venkitaramam, A. R.; Schilling, K. M.; Bowen, W. H. Interactions of *Streptococcal* glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxiapatite. **Arch Oral Biol**, 41: 291-298, 1996.

Vacca-Smith, A. M.; Bowen, W. H. Binding properties of *streptococcal* glucosyltransferase for hidroxiapatite and bacterial surfaces. **Arch Oral Biol**, 43: 103-110, 1998.

Vacca-Smith, A. M.; Bowen, W. H. *In situ* studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Arch Oral Biol**, 45: 277-291, 2000.

van Houte, J.; Gibbs, G.; Butera, C. Oral flora of children with "nursing bottle caries". **J Dent Res**, 61: 382-385, 1982.

Van Loveren, C.; Bujis, J.; Ten Cate, J. M. Similarity of bacteriocin activity profiles of *mutans Streptococci* within the family when the children acquire strains after the age of 5. **Caries Res**, 34 (6): 481-485, 2003.

Venkitaraman, A. R.; Vacca-Smith, A. M.; Kope, I. K.; Bowen, W. H. Characterization of glucosyltransferase B, GtfC and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. **J Dent Res**, 74: 1695-1701, 1995.

Welsh, J.; McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res**, 18: 7213-7218, 1990.

Wen, Z. T.; Burne, R. A. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol**, 68: 1196-1203, 2002.

Wen, Z. T.; Burne, R. A. LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. **J Bacteriol**, 186: 2682-2691, 2004.

Wen, Z. T.; Suntharaligham, P.; Cvitkovitch; Burne, R. A. Trigger factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competent development, and biofilm formation. **Infect Immun**, 73: 219-225, 2005.

Wen, Z.T; Baker, H.V.; Burne, R. A. Influence of BrpA on critical virulence attributes of *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol**, 18 (8): 2983-2992, 2006.

Yamada, T.; Igarashi, K.; Mitsutomi, M. Evaluation of cariogenicity and glucosylsucrose by a new method of measuring pH under human dental plaque *in situ*. **J Dent Res**, 59: 2157-2162, 1980.

Yamashita, Y.; Bowen, W. H.; Burne, R. A.; Kuramitzu, H. K. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the especific-pathogen-free rat model. **Infect Immun**, 61: 3811-3817, 1993.

Yoshida, A.; Kuramitzu, H. K. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a GTF B promoter-green fluorescent protein (PGTFB-gfp) construct to monitor development. **Microbiol**, 148: 3385-3394, 2002.

Anexo I – Parecer do Comitê de ética em pesquisa com humanos.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 13 de Abril de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: INFLUÊNCIA DE FATORES MICROBIANOS E COMPONENTES DO HOSPEDEIRO NO POTENCIAL CARIOGÊNICO DE Streptococcus mutans.

Curso: Odontologia

Grupo: III

Autor (es): Profa. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini; Margareth Bulhman Ballini

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo CAAE: 0077.0.142.000-10 (Citar este número nas correspondências referentes a este projeto)

Prezado (a) (s) Pesquisador (a) (s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou expressamente no dia 13/04/2010 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,

Patrícia de Oliveira Carvalho
Vice- coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - USF
Universidade São Francisco

Ao término do desenvolvimento do estudo o (a) pesquisador (a) responsável deverá enviar ao CEP-USF o relatório consolidado de conclusão do mesmo.

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 403 4-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pan - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

Anexo II – Parecer do Comitê de ética em pesquisa com animais.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO

Bragança Paulista, 12 de Agosto de 2011.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação da resposta imunológica contra a proteína BrpA de *Streptococcus mutans*

ÁREA DE CONHECIMENTO: Saúde e Biológicas

Autor(es): Prof(a). Dr (a). Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini; Margareth Bulhman ;
Rodrigo Cappozoli

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.09.11

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou expressamente dia **12/08/2011** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Carlos Augusto Real Martinez
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

Anexo III – Modelo do questionário de hábitos diários que foi encaminhado aos pais dos alunos envolvidos no projeto.

• **Questionário pessoal**

• Responda às perguntas abaixo referentes ao seu filho (a)

• **Parte I – dados gerais**

• Nome da criança: _____

• Idade: _____ anos

• Sexo Masculino Feminino

• Endereço residencial _____

• _____

• Tem irmãos? Sim Não. Quantos? _____

• Há outras pessoas de 0 a 15 anos de idade morando na mesma casa? Quantos e quais as idades? _____

• _____

• **Parte II – Saúde geral**

• Seu filho (a) tomou antibiótico nestes 30 dias? Sim Não. Qual _____

• Seu filho (a) faz uso freqüente de algum medicamento? Sim Não. Qual? _____

• Possui alguma das doenças abaixo:

• Diabetes Sim Não

• Problema cardíaco Sim Não

• Convulsões Sim Não

• **Parte III – higiene bucal**

• Quantas vezes por dia seu filho (a) escova os dentes?
 Nenhuma Uma Duas Três Mais de três

• Seu filho (a) escova os dentes antes de dormir?
 Sim Não

• Quando seu filho (a) escova os dentes costuma também escovar a língua?
 Sim Não

• Seu filho (a) usa enxaguante bucal?
 Sim Não

• Seu filho está sob tratamento com outro dentista?
 Sim Não

• _____

• A água que seu filho bebe em casa é de mina?
 Sim Não

• Seu filho (a) gosta de doces?
 Sim Não

• Quantas vezes por semana ele (ela) come doce? _____

• Seu filho toma refrigerante?
 Sim Não

• Quantas vezes por semana ele (a) toma refrigerante? _____

Anexo IV – modelo da ficha de avaliação oral das crianças

Ficha dentista

Índice de cárie

Número de dentes restaurados

Número de dentes extraídos

Respirador Bucal

____ Sim ____ Não

Higiene bucal

____ Ruim ____ Mediana ____ Boa

Data da última aplicação de flúor:

Observar boca seca na coleta da saliva e correlação com índice de cárie: