

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

ELOÁ RAMALHO DE CAMARGO

**ANÁLISE DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA
REGULADORA DE BIOFILME A (BrpA) E FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Streptococcus mutans* ASSOCIADOS À
PREVALÊNCIA DE CÁRIE EM CRIANÇAS**

Bragança Paulista

2017

ELOÁ RAMALHO DE CAMARGO – R.A. 001201302047

**ANÁLISE DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA
REGULADORA DE BIOFILME A (BrpA) E FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Streptococcus mutans* ASSOCIADOS À
PREVALÊNCIA DE CÁRIE EM CRIANÇAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco, como requisito
parcial para obtenção do Título de Doutor em
Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Biologia Molecular e
Celular.

Orientador: Profa. Dra. Michelle Darrieux
Sampaio Bertoncini.

Bragança Paulista

2017

QW 142.5 Camargo, Eloá Ramalho de.
C176a Análise de parâmetros imunológicos da proteína reguladora de biofilme a (BrpA) e fatores de virulência de *Streptococcus mutans* associados à prevalência de cárie em crianças / Eloá Ramalho de Camargo. -- Bragança Paulista, 2017.
76 p.


Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

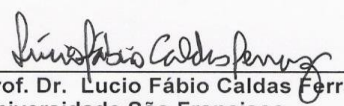
1. *Streptococcus mutans*. 2. Cárie dental. 3. Biofilme.
4. BrpA. I. Bertoncini, Michelle Darrieux Sampaio. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

CAMARGO, R., Eloá, “Análise de Parâmetros Imunológicos da Proteína Reguladora de Biofilme A (BrpA) e Fatores de Virulência de Streptococcus Mutans Associados ao Desenvolvimento de Cárie em Crianças” Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 23 de Fevereiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



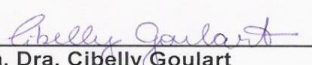
Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini
Universidade São Francisco




Prof. Dr. Lucio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Raquel de Cassia dos Santos
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Cibelly Goulart
Instituto Butantan



Profa. Dra. Natalia Reiko Sato Miyasaka
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779 3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

À minha mãe, às minhas irmãs, meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, me deram suporte pelo exemplo de força, garra, determinação, amor e generosidade.

AGRADECIMENTOS

Em nome de DEUS sou.

Eu agradeço *O Senhor* por me dar força, orientação, tranquilidade para seguir em minha jornada trazendo-me sempre luz, paz e amor. Por colocar diante de mim desafios e abençoar cada passo em direção ao meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional. Pois tudo está nos planos de Deus e sempre há propósito maior.

Sou eternamente grata pela família que me deste, pelo cuidado e amor e sempre estarem ao meu lado, por compreenderem as minhas escolhas e aceita-las. A Família Irie do qual sou muito feliz e me sinto parte integrante. Obrigada por todos os ensinamentos.

Sou eternamente grata aos meus Amigos, pessoas especiais escolhidas por Deus para estarem ao meu lado nos momentos bons e em momentos decisivos, por tornarem estes anos os melhores e mais divertidos que eu poderia ter. A conclusão deste trabalho e a minha evolução pessoal se fizeram possível com companheirismo ao longo deste tempo. As minhas eternas “*Amigas do Lab*”, anos de pesquisa e risadas, o que seria de mim sem vocês. Não tenho palavras pra agradecer por tudo que fizeram por mim.

E aos meus amigos do Lab 7 e em especial ao Jonas por me ensinar a ser uma pessoa melhor e a concluir comigo este projeto.

Agradeço a Dr^a Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini pela oportunidade e orientação durante estes anos. Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro possibilitando o desenvolvimento deste projeto.

“Não te eleves como um touro nos pensamentos de teu coração, para não suceder que a tua
loucura quebre a tua força”

ECLESIÁSTICO 6 1-5

RESUMO

A investigação dos mecanismos envolvidos com a virulência de *Streptococcus mutans* e sua capacidade de tolerar o estresse ambiental compreendem uma etapa essencial ao desenvolvimento de uma vacina para efetiva imunização contra a cárie. A proteína reguladora de biofilme A (BrpA) é um importante fator de virulência de *S. mutans*, cuja deleção causa maior susceptibilidade aos estresses ácido e oxidativo, além de defeitos na reprodução celular. Com base nestas informações, o presente projeto teve como objetivos analisar variações nos padrões de virulência de 24 cepas de *S. mutans* isoladas da saliva de crianças com e sem cárie, e investigar a atividade imunogênica da proteína BrpA como possível candidata vacinal contra esta bactéria. A proteína BrpA foi produzida de forma recombinante em *E. coli*, purificada por cromatografia líquida de afinidade ao Níquel e utilizada na imunização de camundongos. A produção de anticorpos foi avaliada por ELISA. A prevalência de BrpA e sua localização celular foram investigadas por western blot, enquanto a interação com anticorpos foi avaliada por citometria de fluxo. Para comparação dos fatores de virulência entre *S. mutans* isolados de crianças com e sem cárie, foram avaliados a formação de biofilme, a presença do gene *mut IV* e a tolerância ácida. A proteína BrpA recombinante mostrou-se imunogênica em camundongos, induzindo a produção de anticorpos específicos. A análise de prevalência revelou que BrpA está presente em cerca de 87.5% dos isolados de *S. mutans*, sem diferenças significativas entre os grupos com e sem cárie. BrpA foi localizada no protoplasto e parede celular bacterianos. No entanto, a análise preliminar por citometria de fluxo sugere que BrpA não está acessível para interação com anticorpos. Não foram observadas diferenças entre *S. mutans* de crianças com e sem cárie com relação à presença de *mut IV*, formação de biofilme e tolerância ácida. Em conclusão, a proteína BrpA é expressa pela maioria dos isolados clínicos de *S. mutans*, está presente em diferentes compartimentos celulares e é imunogênica. Novos ensaios deverão confirmar se a proteína está acessível aos anticorpos.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Cárie dental. Biofilme. BrpA.

ABSTRACT

The investigation of the mechanisms involved in the virulence of *Streptococcus mutans* and its ability to tolerate environmental stress comprise an essential step in the development of a vaccine for effective immunization against caries. BrpA (biofilm regulatory protein A), is an important virulence factor in *S. mutans* whose deletion results in increased susceptibility to acid and oxidative stresses, as well as defects in cell division. The aim of the present work, was to compare virulence traits of *S. mutans* isolated from children with and without caries, and to characterize the immune response induced in mice by immunization with recombinant BrpA. BrpA was produced in *E. coli*, purified by liquid chromatography and used to immunize mice. Antibody production was evaluated by ELISA. Prevalence and localization were determined by western blot, while protein exposure was assessed by flow cytometry. In parallel, the virulence parameters biofilm formation, acid tolerance and expression of *mut IV* were compared among bacterial strains isolated from caries-free and caries-active children. Recombinant BrpA was immunogenic in mice, leading to production of specific antibodies. Analysis of prevalence revealed the presence of BrpA in 87.5% of the *S. mutans* isolates. BrpA was found in the protoplast and cell wall fractions, and in the supernatant of all except one isolate. However, flow cytometer experiments suggest that BrpA is not available for interaction with antibodies. *S. mutans* isolated from children with and without caries showed a similar prevalence of the *mut IV* gene, and did not differ in their ability to form biofilms *in vitro* or to tolerate acid environment. In conclusion, BrpA is a widely distributed protein present in different compartments of the bacterial cell, and is immunogenic. Further investigation should confirm if this protein is accessible on the bacterial surface to interact with antibodies.

Keywords: *Streptococcus mutans*. Dental caries. Biofilm. BrpA.

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

μL , Micro litro

2YT, meio de cultura 2 x extrato de levedura e triptona

Ag I/II, Antígeno I/II

$\text{Al}(\text{OH})_3$, Hidróxido de alumínio

BHI, meio de cultura infusão coração pulmão

BSA, albumina do soro bovino

dNTPmix, mistura de desoxirribonucleotídeos, A, T, C e G.

DO, densidade ótica

EGM, Estreptococos do grupo *mutans*

ELISA, ensaio imunoenzimático

FITC, Isotiocianato de fluoresceína

FliC, Proteína recombinante flagelina derivada da *Salmonella*

GBP, Proteína de ligação a glucano

GTF, Glicosiltransferase

HRP, peroxidase de raiz forte

IgA, Imunoglobulina A

IgG, Imunoglobulina G

IPTG, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa, kilodaltons

LB, meio Luria-Bertani

MHC, complexo de histocompatibilidade principal

OMS, Organização Mundial de Saúde

OPD, orto-fenilendiamina dicloridrato

PBS, solução salina tamponada

PCR, reação em cadeia da polimerase

RAPD, do inglês *Random Amplification of Polymorphic DNA*

SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

SpaA, adesina A de *S. sobrinus*

TBS-T, tampão Tris salino + 0,5% Tween-20

UFC, unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Processo de desmineralização dos dentes durante o desenvolvimento de cárie..	17
FIGURA 2. Fatores etiológicos determinantes e modificadores da cárie.....	18
FIGURA 3. Estágios de desenvolvimento do biofilme.....	21
FIGURA 4. Fluxograma do processo de imunização dos animais para produção de anticorpos anti-BrpA.....	37
FIGURA 5. Triagem do gene <i>mut IV</i> em amostras de <i>S. mutans</i>	42
FIGURA 6. Amplificação do fragmento gênico <i>gtfB</i> de <i>S. mutans</i>	42
FIGURA 7. Formação de Biofilme por <i>Streptococcus mutans</i>	43
FIGURA 8. Tolerância de <i>Streptococcus mutans</i> à queda de pH.....	44
FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene <i>brpA</i> a partir de amostras de <i>S. mutans</i>	45
FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão do vetor <i>pAE-brpA</i> com a enzima de restrição <i>EcoR I</i>	46
FIGURA 11. Análise da expressão da proteína rBrpA por SDS-PAGE.....	47
FIGURA 12. Análise por SDS-PAGE da proteína rBrpA purificada.....	48
FIGURA 13. Produção de anticorpos anti-BrpA em camundongos.....	48
FIGURA 14. Análise por western blot da expressão de BrpA por isolados de <i>S. mutans</i>	49
FIGURA 15. Localização de BrpA em frações celulares de <i>Streptococcus mutans</i>	50
FIGURA 16. Localização de BrpA em frações celulares de <i>Streptococcus mutans</i> – 2.....	51
FIGURA 17. Histograma da ligação de anticorpos anti-BrpA à superfície de <i>S. mutans</i>	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR.....	33
TABELA 2. Prevalência do gene <i>mut IV</i> em <i>S. mutans</i> isolados de crianças com e sem cárie.....	41
TABELA 3. Prevalência do gene <i>brpA</i> <i>S. mutans</i> isolados de crianças com e sem cárie.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Estabelecimento da Cárie.....	15
1.2 <i>Streptococcus mutans</i>	22
1.3 Mecanismos da patogenicidade de <i>Streptococcus mutans</i>	23
1.4 Proteína Reguladora de Biofilme A.....	25
1.5 Resposta imune do hospedeiro e a cárie dental.....	27
1.6 Vacinas Anti-Cárie.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos Gerais.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Aspectos Éticos.....	32
3.2 Avaliação da virulência de isolados de <i>Streptococcus mutans</i>	32
3.2.1 Análise da presença dos genes <i>mut IV</i> e <i>brpA</i> nos isolados clínicos de <i>S. mutans</i>	32
3.2.2. Ensaio de formação de biofilme em microplaca.....	33
3.2.3 Teste de tolerância ácida.....	34
3.3 Avaliação imunológica de BrpA.....	34
3.3.1 Obtenção da proteína BrpA recombinante.....	34
3.3.1.1 Clonagem do gene <i>brpA</i> em vetor pAE.....	34
3.3.1.2 Expressão heteróloga do gene <i>brpA</i>	35
3.3.1.3 Purificação da proteína BrpA recombinante.....	36
3.3.1.4 Dosagem da proteína BrpA recombinante.....	36
3.3.2 Avaliação da produção de anticorpos em camundongos imunizados com BrpA.....	37
3.3.2.1 Esquema de imunização.....	37
3.3.2.2 Dosagem dos anticorpos por ELISA.....	37
3.3.2.3 Análise da reatividade de anticorpos anti-BrpA com extratos de <i>S. mutans</i>	38
3.3.3 Determinação da localização bacteriana de BrpA.....	39
3.3.4 Ensaio de ligação de anticorpos anti-BrpA à superfície de <i>Streptococcus mutans</i>	40

3.4 Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Avaliação dos fatores de virulência de <i>Streptococcus mutans</i>	41
4.1.1 Presença do gene <i>mut IV</i>	41
4.1.2. Formação de Biofilme por <i>Streptococcus mutans</i>	43
4.1.3 Tolerância ácida.....	44
4.2 Avaliação imunológica de BrpA.....	45
4.2.1 Presença do gene <i>brpA</i> em isolados clínicos de <i>Streptococcus mutans</i>	45
4.2.2 Clonagem, expressão e purificação de BrpA recombinante.....	46
4.2.3 Obtenção da proteína BrpA recombinante.....	47
4.2.4 Avaliação da resposta imune humoral induzida em camundongos.....	48
4.2.5 Prevalência da proteína BrpA em isolados de <i>Streptococcus mutans</i>	49
4.2.6 Localização de BrpA nos isolados de <i>Streptococcus mutans</i>	49
4.2.7 Ligação de anticorpos anti-BrpA em <i>Streptococcus mutans</i>	51
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	70
APÊNDICE.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estabelecimento da Cárie

A cárie é uma doença multifatorial, que tem se destacado por sua elevada prevalência na população infantil e o impacto negativo que exerce sobre o bem estar físico e psíquico, o que implica na redução de qualidade de vida. Aspectos relacionados ao desenvolvimento da cárie na infância têm motivado diversos estudos. Segundo Caufield et al. (1993), a “janela de infectividade” é definida pela idade cronológica na qual a criança está mais suscetível à colonização por *Streptococcus mutans*, com o aparecimento dos primeiros dentes que apresentam fissuras em sua superfície, ou seja, os molares, entre 19 e 31 meses de idade. Entretanto, esses micro-organismos só irão colonizar efetivamente essas estruturas se encontrarem condições favoráveis, como por exemplo, alta frequência de exposição à sacarose e inadequado controle mecânico do biofilme (LAW et al., 2007). Além disso, deve ser ressaltado que *Streptococcus mutans*, embora de importância bastante expressiva, por si só não são capazes de promover o aparecimento das lesões cáries, visto que a cárie é complexa e envolve inúmeros fatores.

A fim de avaliar as possíveis causas e efeitos da cárie dental sobre a população brasileira, o Ministério da Saúde do Brasil publicou em 2011, dados e indicadores coletados no último levantamento epidemiológico em nível nacional (SB Brasil 2010). Para avaliar a condição dentária foi utilizado o índice preconizado pela OMS (Organização Mundial da Saúde, 1997), que inclui os valores de ceo-d (dentição decídua) e CPO-D (dentição permanente) médios. A soma ceo-d +CPO-D expressa o número de dentes cariados, perdidos/extraídos e obturados (Ministério da saúde, 2010). Observou que 53,4% das crianças de 5 anos de idade apresentavam pelo menos um dente decíduo com experiência presente ou passada de cárie dentária, e um índice ceo-d de 2,43. Particularmente na região norte, o pior resultado foi verificado e o índice o ceo-d chegou a atingir 3,47 (Ministério da Saúde, 2010).

Um indicativo favorável para a saúde bucal é o número de pessoas livres de cárie. Para essa avaliação a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere os 12 anos como idade índice para avaliação da dentição permanente em crianças. Segundo o Portal Saúde (2012) aos 12 anos, a doença atingia 69% da população em 2003. Essa porcentagem diminuiu para 56% em 2010, o que corresponde a uma diminuição de 19% na prevalência da enfermidade. O número médio de dentes afetados por cárie também diminuiu nas crianças: era 2,8 em 2003 e caiu para 2,1 em 2010 – uma

redução de 25%. Em suma, os resultados dos três inquéritos no Brasil apontam, aos 12 anos, um aumento das crianças livres de cárie de 3,1%, em 1986 para 31% em 2003, alcançando 44% em 2010, um dado considerado positivo (COSTA et al., 2013). No entanto, apesar da redução nos índices de cárie, ainda há muitas regiões do Brasil em que uma parcela significativa da população apresenta o problema, como as regiões norte, nordeste e centro-oeste.

Dessa forma, o impacto da cárie sobre a saúde coletiva ainda permanece alto, fomentando estudos que visam o desenvolvimento de medidas preventivas e programas educativos eficazes em âmbito nacional (GAMBHIR et al., 2012).

A cárie resulta de um desequilíbrio entre os processos des-remineralização, onde a desmineralização prevalece. A perda mineral acentuada provoca uma destruição localizada de tecidos dentais duros por ácidos, subprodutos da fermentação dos carboidratos da dieta por micro-organismos (ALBINO, TIWARI, 2016).

O dente é constituído por tecidos mineralizados, formados principalmente por hidroxiapatita, e uma porção não mineralizada, que corresponde ao tecido pulpar. A porção do dente visível na cavidade bucal, conhecida como coroa, é constituída pelo esmalte, pela dentina e pela polpa coronária. O esmalte é a porção mais superficial e a mais mineralizada de todas as camadas, e apresenta um papel protetor (GOLDBERG et al., 2011; WEST, JOINER, 2014). A hidroxiapatita é composta de sais de fosfato de cálcio (**FIGURA 01**) dependendo das condições do meio, pode sofrer um processo de desmineralização ou remineralização. Este processo de desmineralização normalmente é reversível em pH fisiológico, onde as concentrações de cálcio e de fosfato encontram-se altas, estando a saliva supersaturada em relação à hidroxiapatita (LIMA 2007; GUO, SHI, 2013).

No entanto, a presença de micro-organismos cariogênicos, como *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus spp*, favorece a produção de ácidos orgânicos como um subproduto do metabolismo de carboidratos fermentáveis. Isso faz com que o pH (aciduridade) diminua a valores críticos, provocando a desmineralização do esmalte dos dentes; a concentração de hidrogênio aumenta, deslocando os íons de cálcio e fosfato da porção mineral (SELWITZ et al., 2007) (**FIGURA 01**).

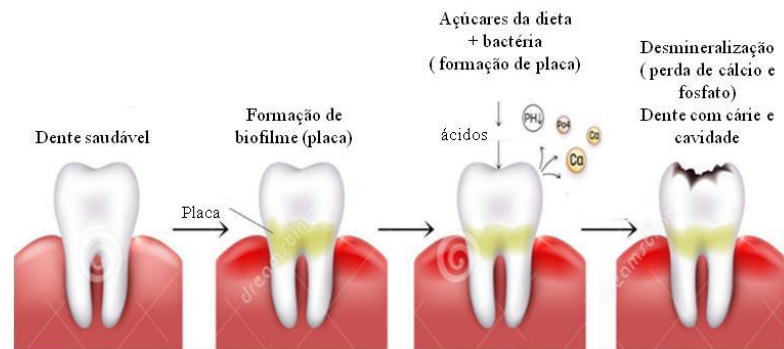


FIGURA 01. Processo de desmineralização dos dentes durante o desenvolvimento da cárie. A formação do biofilme é decorrente de diversos fatores. Bactérias cariogênicas, estabelecidas no biofilme, têm a capacidade de converter açúcares em ácidos a partir de substratos da dieta. Esses ácidos orgânicos promovem a desmineralização dos dentes, levando à perda de cálcio e fosfato dos cristais, solubilizando a hidroxiapatita. Esse processo tem por consequência o estabelecimento das lesões de cárie propriamente dita e aparecimento das lesões de mancha branca ativas e cavidades (DREAMSTIME, 2016).

A cárie inicial é chamada de "mancha branca ativa"; corresponde a uma área opaca e esbranquiçada que pode ser facilmente diferenciada do esmalte saudável. Se a mancha branca é visível apenas após secar a superfície, a lesão não é considerada avançada. Neste estágio, a progressão da lesão pode ser interrompida pela remoção adequada do biofilme bacteriano e tratamento da área com procedimentos minimamente invasivos (SKUCHA-NOWAK et al., 2015). Os fatores inerentes ao hospedeiro, associados ao desenvolvimento da cárie incluem: hábitos incorretos de higiene bucal; dieta rica em carboidratos; fatores genéticos; composição da saliva e presença de micro-organismos acidogênicos na cavidade bucal (LIMA, 2007). Além disso, fatores socioeconômicos como: renda, educação, fatores comportamentais e escolaridade também exercem influência significativa (LAMONT et al., 2006) (**FIGURA 02**).

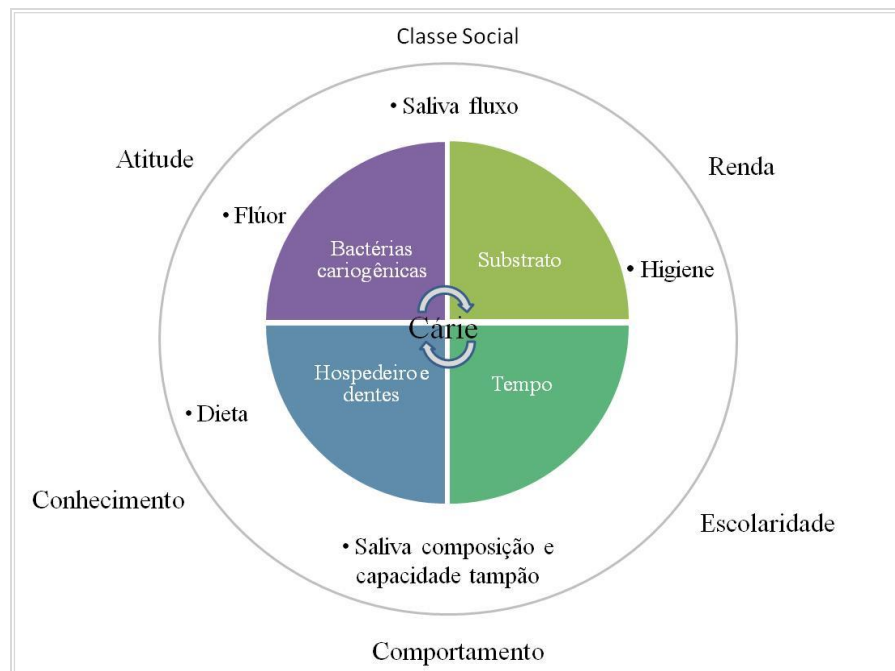


FIGURA 02. Fatores etiológicos determinantes (círculo interno) e modificadores (parte externa) da cárie. Fatores socioeconômicos como renda, escolaridade e classe social influem na dieta, higiene e acesso à água fluoretada, que interferem com a microbiota bucal e a demanda de substratos que são convertidos em ácidos. Adaptado de Manji e Fejerskov (1990).

Com relação à dieta, o aumento do consumo de alimentos cariogênicos pode contribuir com o desenvolvimento de lesão cariosa, aumentando a produção de ácidos que compromete a capacidade tamponante da saliva, podendo levar à desmineralização dentária. Considera-se que uma dieta é cariogênica quando possui uma relação positiva entre a quantidade de hidratos de carbono consumidos e o tempo de exposição a estas substâncias, principalmente a sacarose, que são utilizadas como substrato pelos micro-organismos para sintetizarem polissacarídeos extracelulares insolúveis, essenciais para a formação do biofilme (GUO et al., 2006).

A presença de flúor na água também apresenta um impacto na prevalência da cárie; a presença constante de flúor na saliva muda suas propriedades físico-químicas com relação ao chamado pH crítico de dissolução do dente. Levando-se em consideração as implicações clínicas, o pH crítico para o esmalte é diferente do da dentina. Do mesmo modo, enquanto a saliva consegue proteger o esmalte até que o pH não seja inferior a 5,5, a dentina é mais sensível e não resiste a um pH inferior a 6,5. Isto é relevante quando se discute a cariogenicidade de alimentos, considerando

o chamado pH crítico (CURY et al., 2001). A presença do flúor favorece a remineralização e dificulta a desmineralização.

A composição da saliva desempenha um papel central na proteção contra o desenvolvimento da cárie, exercendo ações mecânicas, químicas e bacteriostáticas. A saliva possui capacidade tampão com pH entre 6.5 e 7.4. Os tampões salivares de maior importância são o sistema ácido carbônico/bicarbonato e o sistema fosfato. Quando o pH intra-oral se encontra baixo, estes sistemas atuam, resultando na formação de compostos alcalinos que irão neutralizar o efeito ácido. As proteínas são transformadas em peptídeos e, através da ação das peptidases, são convertidas em aminoácidos, que ao sofrerem outros tipos de alterações dão origem a formas básicas (GUO, SHI, 2013). Exerce também efeito tampão pelos fosfatos, pelas histatinas, e pela sialina, sendo que este último é transformado em amoníaco e putrescina que fazem aumentar os valores de pH (GUO, SHI, 2013). A água é o constituinte principal da saliva e representa 99% da secreção glandular pura, sendo que o restante é composto de sódio, potássio, bicarbonato, cloreto, cálcio e fosfato. O fluxo salivar auxilia na remoção de resíduos alimentares, removendo ainda microrganismos não aderidos à superfície do dente, além de possuir ação antibacteriana por conter proteínas e imunoglobulinas (GUO, SHI, 2013).

Dentre todos os nichos do corpo humano, a cavidade bucal é a que apresenta a maior diversidade de micro-organismos. Cerca de 700 espécies de bactérias diferentes foram identificadas na cavidade oral, 40 delas isoladas somente em casos de cárie (SALLI, OUWEHAND, 2015). A composição de espécies na placa bacteriana pode variar entre os indivíduos, e a grande diversidade da microbiota bucal está associada não somente à cárie, como também à gengivite, periodontite (OPPERMANN, WEIDLICH, MUSSKOPF, 2012) e outras doenças crônicas ou sistêmicas, como endocardite infecciosa (SEKIROV et al., 2010). Na cavidade oral, os micro-organismos permanecem como patógenos oportunistas, encontrados comumente como membros da microbiota residente de indivíduos sem cárie e que podem expressar a sua patogenicidade somente em condições ambientais específicas (LIF HOLGERSON, et al., 2015).

A fim de identificar a microbiota associada à cárie, estudos têm apostado na metodologia de *Multiplex*, realizados principalmente em crianças que apresentavam quadro de cárie precoce na infância (CPI). Os resultados demonstram que há uma variabilidade grande de organismos envolvidos com o desenvolvimento de cárie, incluindo os gêneros *Streptococcus*, *Veillonella* e

Lactobacillus (especialmente em cárie de dentina) (TANNER et al., 2011). Segundo Simmonds, Tompkins, George (2000) e Conrads et al. (2014), *S. mutans* e *S. sobrinus* são consideradas as espécies mais importantes na cárie humana. Estudos epidemiológicos mostraram, em crianças da idade pré-escolar até os 15 anos, uma correlação positiva entre os níveis de colonização por *S. mutans* e *S. sobrinus* e a presença de cárie dentária. Além disso, a presença concomitante de ambas as espécies estava associada a uma maior incidência de cárie, quando comparada aos indivíduos colonizados apenas por *S. mutans* (CONRADS et al., 2014).

Em algumas lesões de cárie, *S. mutans* pode ser um componente menor do biofilme dentário, com uma maior prevalência de gêneros como *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, e *Atopobium* (XU et al., 2014). Além disso, sugere-se que *Actinomyces spp.* e outras espécies que não pertencem ao grupo mutans possam estar envolvidas na iniciação da doença. Isolado de lesões de cárie, *Actinomyces odontolyticus* também coloniza crianças antes da erupção dos dentes. Algumas lesões de cárie de raiz são dominadas por *Actinomyces naeslundii* e tem sido sugerido que as linhagens desta espécie possam desempenhar um papel preponderante nesta doença. *A. israelii* e *A. gerencseriae* também foram isoladas de lesões de cárie radicular (TANNER et al., 2011).

A cárie está relacionada ao metabolismo bacteriano, em particular à formação de biofilmes na cavidade oral (CVITKOVITCH, LI, ELLEN, 2003). Os biofilmes orais são aglomerados microbianos imersos em uma matriz de polissacarídeos extracelulares, que confere aderência e permite a multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre a superfície dos dentes, na presença de um substrato (CVITKOVITCH, LI, ELLEN, 2003; LOPEZ, VLAMAKIS, KOLTER, 2010).

A formação de biofilme é uma etapa importante na colonização bacteriana e no estabelecimento de diversos quadros infecciosos, relacionada a uma maior proteção contra o sistema imune e contra agentes antimicrobianos (DONLAN, COSTERTON, 2002; DAVIES, 2003) Sugere-se que a matriz formada por polissacarídeos na qual o biofilme fica embebido facilita a formação de nichos de pH ácido que favorecem a sobrevivência de bactérias com características acidúricas e acidogênicas, (incluindo *S. mutans*, *Actinomyces* e *lactobacilos*), e conseqüentemente possa modular a atividade microbiana, virulência e a patogênese da cárie dental (ALALUUSUA et al., 1996; KAMIYA et al., 2005; KOO, FALSETTA, KLEIN, 2013; KLEIN et al., 2015).

Logo após a adesão das células bacterianas, há uma cascata de eventos que regulam o acúmulo do biofilme. Através do processo de *quorum sensing* ocorre um aumento na produção, na liberação e na detecção de moléculas sinalizadoras auto indutoras. Conseqüentemente com o aumento da densidade bacteriana, essas moléculas auto indutoras podem se acumular e induzir a transcrição de genes específicos que regulam várias funções como motilidade, virulência, e até mesmo a produção de matriz exopolissacarídica (EPS) (HOIBY et al., 2011).

O padrão geral de formação do biofilme inclui: i) adesão inicial de células a uma superfície sólida; ii) multiplicação das células aderidas; iii) formação de micro colônias; iv) produção de uma matriz de polissacarídeos extracelulares e v) diferenciação em um biofilme tridimensional. Alguns biofilmes maduros são caracterizados pela formação de estruturas em forma de cogumelos ou torres, com canais internos de água que permitem a entrada de nutrientes e a saída de produtos finais do metabolismo (**FIGURA 03**) (LOPEZ, VLAMAKIS, KOLTER, 2010)

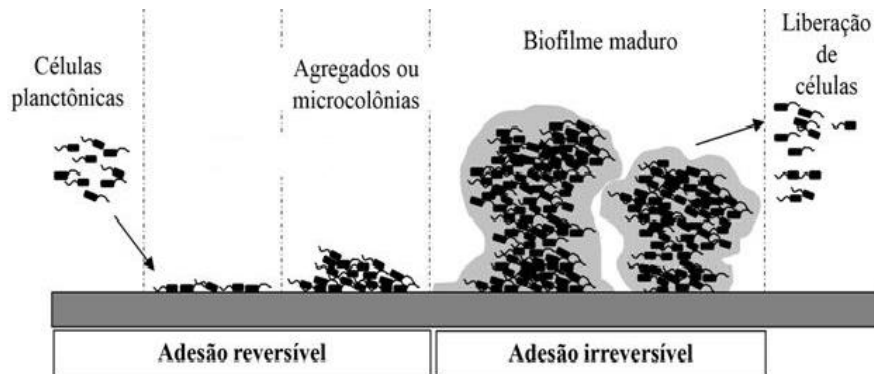


FIGURA 03. Estágios de desenvolvimento do biofilme. Os estágios de desenvolvimento do biofilme podem ser entendidos como: Fase de adesão reversível, na qual células planctônicas se aderem formando micro colônias; Fase de adesão irreversível, com a formação de estruturas com formato típico de cogumelos característica do biofilme maduro e, por fim, ruptura dos biofilmes havendo liberação de parte das células. Adaptado de Macedo e Abraham (2009).

O desenvolvimento da cárie está intimamente relacionado à formação do biofilme, que possibilita interações complexas entre os micro-organismos específicos, comprometendo a saúde de crianças e adultos. Ainda, embora o controle eficiente da cárie envolva medidas preventivas de baixa complexidade, como por exemplo, escovação adequada e controle de dieta, esses fatores dependem intimamente da mudança de hábito dos indivíduos, o que é extremamente difícil. Por

isso, o desenvolvimento de estratégias preventivas, que não dependam da colaboração do hospedeiro, como as vacinas, por exemplo. Essas vacinas tem o objetivo não de erradicar as bactérias cariogênicas, mas de dificultar sua adesão no biofilme, diminuindo a cariogenicidade do mesmo, especialmente naqueles grupos de crianças de baixa idade, que sofrem muito com as consequências da doença e não tem condições de arcar com um tratamento adequado.

1.2 *Streptococcus mutans*

Identificado pela primeira vez em lesões cárias profundas, *S. mutans* são cocobacilos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e catalase-negativos. Com relação à classificação taxonômica, os estreptococos cariogênicos pertencem ao “grupo mutans”, que inclui 7 espécies distintas de bactérias: *S. mutans*; *Streptococcus sobrinus*; *Streptococcus Cricetus*; *Streptococcus rattus*; *Streptococcus ferus*; *Streptococcus macacae* e *Streptococcus Downei*, sendo que *S. mutans* e *S. sobrinus* são exclusivos de humanos (HAMADA, SLADE, 1980). Segundo Leites, Pinto e Sousa (2006), *mutans* e *sobrinus* apresentam maior potencial cariogênico em humanos; as demais espécies são encontradas em animais ou ainda quando identificadas em humanos, não são consideradas altamente cariogênicas.

Primeiramente encontrado sobre a superfície dos dentes, após a colonização, foi observada a presença do micro-organismo na saliva, na língua e nas membranas mucosas. *S. mutans* é uma bactéria acidogênica, capaz de fermentar glicose, lactose, rafinose e manitol, com produção de ácidos orgânicos (TAKAHASHI, NYVAD, 2011).

Considera-se que variações na frequência e distribuição de micro-organismos, observada em diferentes populações, além de fatores como o número de dentes irrompidos, interações bacterianas, capacidade imunológica do hospedeiro, idade, higiene bucal e consumo de sacarose, levam à seleção de bactérias que fermentam carboidratos e produzem ácidos (CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993; DASANAYAKE et al., 1993; ALALUUSUA et al., 1996; SMITH, MATTOS-GRANER, 2008). Essas bactérias cariogênicas acidogênicas (produtoras de ácido) e acidúricas (tolerantes ao ácido) tais como *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. quando produzem ácidos acarretando a diminuição do pH a níveis crítico, pode resultar em lesões cárias (PETERSON et al., 2011).

Não só a presença, mas também a idade em que ocorre a colonização pelo grupo *mutans*, é importante para o desenvolvimento da lesão cariosa. A infecção precoce por estreptococos cariogênicos aumenta significativamente o risco de cárie na dentição decídua (FUJIWARA et al., 1991). A transmissão das bactérias envolvidas no desenvolvimento da cárie dental tem levado a conclusões diversas e contrastantes. No sentido de se compreender as bases epidemiológicas da cárie, foram criados indicadores de saúde dental tais como índices de cárie e contagens de estreptococos cariogênicos, os quais sugerem que a rota mais provável de transmissão dessas bactérias ocorra nos pares mães-filhos bebês e mães-filhos adolescentes, embora existam eventuais variações (ROSA, GONÇALVES, ROSA 2005). Há evidências de que as mães ou outros cuidadores sejam a fonte primária de infecção nas crianças, já que um mesmo sorotipo tendia a ocorrer simultaneamente em pares mães-filhos e que essa transmissão podia ser veiculada repetidamente pela saliva (CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993; DASANAYAKE et al., 1993; LI, CAUFIELD, 1995). Contudo, essas bactérias só irão colonizar efetivamente os elementos dentários se encontrarem condições favoráveis.

1.3 Mecanismos da patogenicidade de *Streptococcus mutans*

A patogenicidade de *S. mutans* está diretamente relacionada ao seu metabolismo (LEMOS, BURNE, 2008) sua capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade) e de tolerar o ambiente ácido (aciduridade). Isso pode tornar esta espécie significativamente mais numerosa no biofilme cariogênico (LEMOS, BURNE, 2008). Além dessas características, a elevada capacidade de adesão e colonização da superfície dos dentes fazem de *S. mutans* o principal agente microbiano associado ao desenvolvimento de lesões de cárie (BANAS, VICKERMAN, 2003).

A classificação sorológica de *S. mutans* baseia-se na estrutura do polissacarídeo ramnose-glicose da parede celular bacteriana (YAMASHITA et al., 1998). Três sorotipos foram prevalentes na espécie humana, *c*, *e* e *f*, e sua presença está associada à habilidade da bactéria em colonizar o dente. As cepas de sorotipo *c* são predominantes na cavidade oral, sugerindo que este tipo de polissacarídeo pode conferir uma vantagem durante a colonização (GRONROOS et al., 1995). Em crianças com idade pré-escolar, foi observada uma correlação positiva entre a infecção mista por

S. mutans de dois sorotipos, e a presença de lesões cáries, sugerindo que uma maior diversidade dos polissacarídeos contribui para um maior potencial cariogênico (SHIBATA et al., 2003).

A colonização da superfície dos dentes por *S. mutans* é de extrema importância para a formação do biofilme, ou placa bacteriana. A adesão está intimamente relacionada ao consumo de sacarose, e é mediada principalmente pela ação de moléculas de adesão. A enzima glicosiltransferase (GTF) é responsável por metabolizar glucanos solúveis e insolúveis em água, dando origem à matriz, que permite a colonização bacteriana sobre a hidroxiapatita do dente, e o consequente estabelecimento da cárie dentária (BOWEN, KOO, 2011). O processo envolve também adesinas de superfície da família de adesinas SpaP, também chamadas de antígenos I e II (AgI/II) ou de P1, além de proteínas de ligação a glucano (Gbps); estas últimas participam ativamente da adesão de *S. mutans*, formando uma ponte que une as superfícies celulares dos microrganismos à matriz extracelular de glucanos e favorece a formação de um biofilme cariogênico (BANAS, VICKERMAN, 2003; BANAS, 2004)

A exposição frequente dos micro-organismos que compõem o biofilme a carboidratos fermentáveis (acidogenicidade) leva à diminuição do pH (JENSEN, SCHACHTELE, 1983). Nestas condições, micro-organismos resistentes a ácidos são selecionados e o biofilme cariogênico é formado. Há uma prevalência principalmente de *S. mutans* e outros microrganismos acidúricos como os lactobacilos e leveduras, que tem habilidade de produção de ácidos, principalmente ácido láctico (VAN HOUTE, 1980).

À medida que o pH do biofilme é reduzido, a capacidade acidúrica permite a sobrevivência de *S. mutans*, graças à presença de uma bomba translocadora de prótons H⁺ na membrana celular, denominada sistema F₀F₁ ATPase, que mantém o pH intracelular por volta de 7,5; este sistema permite que a bactéria mantenha suas atividades metabólicas. Também ocorre a inibição de enzimas glicolíticas intracelulares, sensíveis ao pH mais ácido (LEMOS, BURNE, 2008).

Segundo Wen et al. (2010) as interações entre os micro-organismos que colonizam a cavidade oral são os principais fatores que afetam o desenvolvimento do biofilme. A virulência de *S. mutans* depende não só das condições ambientais da cavidade oral, mas também da composição da microbiota. Mudanças nas condições ambientais, como redução do fluxo salivar ou a diminuição do pH do biofilme, inibem o crescimento de diversos micro-organismos comensais, como por exemplo o *S. sanguinis*, favorecendo o crescimento de *S. mutans* (MARSH, 1999)

Além de sua elevada habilidade em aderir ao dente e tolerar o estresse ácido, *S. mutans* também é capaz de produzir mutacinas, peptídeos com ação bacteriostática que inibem o crescimento de micro-organismos competidores na cavidade oral. Com base em sua estrutura química, as mutacinas são classificadas em dois grupos: as lantibióticas (que incluem as mutacinas I, II e III) e as não-lantibióticas, termoestáveis (mutacinas IV e V) (CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993). Cerca de 70 a 100% dos isolados de *S. mutans* produzem ao menos um tipo de mutacina (PARROT, CAUFIELD, LAVOIE, 1990) revisado por KAMIYA et al. (2005) que variam quanto ao espectro de ação antimicrobiana. A análise da diversidade genotípica das mutacinas em isolados de *S. mutans* demonstrou uma correlação entre a presença do gene *mut IV* (que codifica a mutacina IV), e o potencial cariogênico dos micro-organismos (KAMIYA et al., 2005). Este efeito foi atribuído à ação inibitória deste peptídeo, que possivelmente favoreceu o estabelecimento de *S. mutans* por competição. De fato, já foi demonstrado que a atividade antimicrobiana das mutacinas confere uma vantagem ecológica durante a fase de colonização oral (BALAKRISHNAN, SIMMONDS, TAGG, 2000).

Devido ao papel central da formação do biofilme oral para o desenvolvimento da cárie, o estudo de fatores bacterianos que contribuem para este processo pode permitir o desenvolvimento de estratégias profiláticas eficazes contra este micro-organismo. Neste contexto, a proteína reguladora de biofilme A (BrpA) surge como um antígeno promissor, devido à sua atuação como regulador transcricional e envolvimento na formação do biofilme, autólise e divisão celular (WEN et al., 2010). Esta proteína será discutida a seguir.

1.4 Proteína Reguladora de Biofilme A

O gene *brpA* (sigla em inglês para *biofilm regulatory protein A*), também conhecido como *lytR*, foi identificado através de uma busca por reguladores transcpcionais no genoma da cepa padrão de *S. mutans*, UA159 (WEN, BURNE, 2002; BITOUN et al., 2013). É um parálogo da família LytR-cPSA-Psr (LCP), que codifica proteínas associadas à parede celular altamente conservadas nas bactérias Gram-positivas (HUBSCHER et al., 2008). Estas proteínas desempenham papéis importantes na formação do envelope celular, na modulação do metabolismo bacteriano ao meio ambiente e na regulação de uma variedade de processos celulares, incluindo a

motilidade, a produção de proteases, e a formação de biofilme por *S. mutans* (BITOUN et al., 2012).

Estudos com bactérias mutantes que não produzem BrpA mostraram que elas apresentam alterações significativas no metabolismo celular, incluindo reduzida capacidade de formação do biofilme e de ligação de dextrano, menor tolerância ácida, além da formação de cadeias mais longas em pH mais baixo, devido à deficiência da proteína ligante de glucano C (GbpC), diminuindo sua adesão a superfícies (NAKANO et al., 2005).

Em um estudo utilizando bactérias mutantes BrpA-negativas, foi observada uma elevada taxa de autólise e formação de longas cadeias em comparação com os isolados selvagens, sugerindo que BrpA está envolvida na regulação de genes que são necessários para a formação de biofilme estável por *S. mutans* (WEN, BAKER, BURNE, 2006). A cepa mutante BrpA-negativa formou principalmente longas cadeias de células, sugerindo que a deficiência de BrpA compromete a separação das células-filhas após a duplicação. Em relação ao tipo selvagem, linhagens de *S. mutans* negativas para BrpA também apresentaram uma maior susceptibilidade aos antimicrobianos, além de redução drástica na tolerância aos estresses ácido e oxidativo (CHATFIELD, KOO, QUIVEY, 2005; WEN, BAKER, BURNE, 2006; BITOUN et al., 2012). Estas evidências fazem da proteína BrpA um componente chave na formação do biofilme e na complexa interação entre as espécies bacterianas. De forma interessante, a infecção de ratos Sprague-Dawley com a linhagem BrpA-negativa levou a uma maior agregação plaquetária, quadro de bacteremia e inflamação sistêmica, que foi correlacionada a uma maior resistência à fagocitose pelas bactérias mutantes, e indução de agregação de plaquetas (NAKANO et al., 2005). Este resultado é possivelmente devido à formação de cadeias mais longas no mutante, reduzindo sua fagocitose.

Além de BrpA, *S. mutans* possui o gene BrpB, que é expresso juntamente com BrpA e também participa da manutenção da integridade da parede celular (BITOUN et al., 2011). Estudo utilizando bactérias duplo mutantes para BrpA-BrpB sugerem que BrpB provavelmente funciona em conjunto com BrpA na regulação da biogênese/homeostase do envelope celular em *S. mutans* (BITOUN et al., 2011). A construção de duas linhagens mutantes, sendo uma deficiente em BrpB e outra deficiente em BrpA e BrpB, em comparação com a linhagem selvagem UA159, mostraram uma diminuição na taxa de crescimento em meio de cultura e a formação de biofilmes

drasticamente reduzida, especialmente durante o crescimento em meio contendo sacarose, além de maior suscetibilidade ao meio pH ácido e ao peróxido de hidrogênio. A análise por microscopia mostrou que a bactéria BrpB-deficiente tinha células significativamente maiores com uma morfologia alongada, enquanto o duplo mutante apresentou células mais arredondadas e com defeitos na divisão celular. A complementação com os genes restabeleceu parcialmente a resistência ao meio ácido e ao estresse oxidativo (BITOUN et al., 2011).

BrpA também atua em conjunto com Psr, uma proteína que regula a produção de glucanos pela bactéria. Mutantes que não expressam Psr são incapazes de formar biofilmes, devido à reduzida produção de glucanos, e apresentam menor sobrevivência em meio ácido (BITOUN et al., 2013). Estudos recentes apontam que deficiência dupla de BrpA e Psr é letal para a bactéria. Acredita-se que a modulação das competências relacionadas com a BrpA seja dificultada, restringindo a atividade cariogênica apresentada pelo *S. mutans*, prevenindo o acúmulo bacteriano na superfície do dente e a formação de biofilme maduro (BITOUN et al., 2013)

Estes dados ressaltam a importância da proteína BrpA na formação do biofilme e no desenvolvimento da cárie. Contudo, a localização do BrpA na superfície da bactéria ainda não foi inteiramente elucidada. Estudos de bioinformática sugerem uma localização no envelope celular (BITOUN et al., 2012), porém, sua acessibilidade para interagir com anticorpos – um atributo desejável em uma vacina – não foi investigada.

1.5 Resposta imune do hospedeiro e a cárie dental

Desde o reconhecimento do *S. mutans* como principal micro-organismo cariogênico, a possibilidade desenvolver uma vacina contra cárie dentária tem-se tornado uma alternativa interessante. O sistema imune pode influenciar na composição de comunidades microbianas na cavidade oral que é munida de defesas humorais e celulares (HAMADA, SLADE, 1980).

Os mecanismos de resposta imune contra bactérias extracelulares incluem a imunidade inata e adaptativa, atuando de forma sinérgica. Os mecanismos celulares dependem dos leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e monócitos que também atingirão a placa via exudato gengival permitindo a fagocitose. A resposta humoral envolve a produção local de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) na gengiva e glândulas salivares, além das imunoglobulinas sistêmicas (do soro) que penetram via exudato gengival. Tais anticorpos podem bloquear as adesinas da superfície

bacteriana, importantes para a interação com as superfícies orais, induzir a aglutinação de bactérias e interferir em importantes enzimas extracelulares ou da membrana da célula, como por exemplo, as glicosiltransferases (SMITH, 2002; PACHECO, 2007).

A imunoglobulina A aglutina micro-organismos na saliva, inibindo sua aderência na superfície da mucosa ou dos dentes, e facilitando a remoção pela deglutição. Os complexos imunes formados por IgG podem ativar o sistema complemento e agir como opsoninas, facilitando a fagocitose e a morte bacterina. Em um estudo realizado por Lehner et al. (1978), foi demonstrado que a fagocitose mediada por IgG tem função importante na eliminação de *S. mutans* da placa dental em macacos vacinados contra este micro-organismo.

Em outro estudo, a imunização local com antígenos isolados de *S. mutans*, induziu um aumento nos níveis de IgA salivar e também de IgG, que se correlacionou com uma diminuição na colonização bacteriana (RUSSELL et al., 2004).

1.6 Vacinas Anti-Cárie

Desde o estabelecimento da conexão entre a presença de bactérias acidogênicas na boca – especialmente *S. mutans* – e o desenvolvimento de lesões cáries, diferentes grupos têm estudado estratégias vacinais contra esta bactéria. Uma vez que a formação de biofilme é o principal mecanismo responsável pela sobrevivência de *S. mutans* na cavidade oral, estando diretamente envolvida no desenvolvimento de lesões cariosas, a capacidade de limitar a formação de biofilmes cariogênicos é uma característica desejável em vacinas contra esta bactéria. Enquanto as células bacterianas planctônicas são susceptíveis à ação de anticorpos, à fagocitose e a antibióticos, as bactérias já aderidas à superfície são resistentes (EKSTRAND et al., 1995). As estratégias vacinais investigadas contra *S. mutans* incluem o uso de componentes celulares que atuam como fatores de virulência, como adesinas, dextranases, proteínas ligantes de glucano, polímeros de superfície celular (que promovem a aderência à película salivar) e as enzimas glicosiltransferases.

Os estudos iniciais sobre vacinas anti-cárie eram baseados em células vivas (atenuadas) e inativadas (por processo químico e físico) de *S. mutans* como agentes imunogênicos. Embora capazes de induzir respostas imunológicas potentes, os primeiros ensaios mostraram reação cruzada com tecido cardíaco humano, que impossibilitam sua utilização como vacinas (KOGA et al., 2002). Desde então, outras possibilidades vêm sendo investigadas como o uso de vacinas de

subunidades (polissacarídicas, proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e vacinas conjugadas), anti-idiotípicas (dirigidas contra as regiões hipervariáveis de um anticorpo) e de DNA (KOGA et al., 2002).

Segundo Han, Zhang e Dao (2006), investigaram a eficiência imunológica de uma vacina contendo a proteína WapA (do inglês *cell-wall associated protein A*), que participa do processo de adesão bacteriana. A imunização de ratos com duas doses de WapA recombinante induziu a produção de IgA salivar nos animais, capazes de inibir a aderência bacteriana dependente de sacarose.

As vacinas conjugadas, que incluem proteínas quimicamente fusionadas a polissacarídeos, também surgem como uma estratégia interessante, por sua capacidade de ativar respostas imunes dependentes de linfócitos T. Enquanto os polissacarídeos isolados induzem a produção de anticorpos sem a participação dos linfócitos T, as vacinas conjugadas, ao promoverem a ativação conjunta de linfócitos T e B, induzem respostas caracterizadas pela presença de células de memória, aumento de IgG em relação ao IgM, além de maior eficácia em crianças (SMITH, 2010).

Também deve ser levada em consideração a necessidade de imunizar bebês ou crianças pequenas, a fim de fornecer proteção imunológica antes da colonização inicial pelos *S. mutans*, e se há a necessidade de vacinação de reforço (CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993; LI, CAUFIELD, 1995).

Com o intuito de potencializar as respostas imunes e ampliar a cobertura vacinal, vacinas de subunidades múltiplas contendo epítomos fusionados foram construídas. Estas formulações incluem diferentes regiões do mesmo componente – por exemplo: atividade catalítica e atividade de ligação a glucano das GTFs – ou moléculas diferentes que podem ser fusionadas, como Ag I/II e GTF (SMITH, 2002; KAUR, GUPTA, SHARMA, 2013).

Outra estratégia vacinal em estudo contra a cárie é o uso de vacinas de DNA. Segundo Shi et al. (2012), o maior desafio dessas formulações é sua baixa imunogenicidade. Neste sentido, a utilização de adjuvantes, como a proteína recombinante flagelina (FliC) derivada de *Salmonella* pode ampliar a imunogenicidade da vacina. Em estudo que avaliou a imunização intranasal utilizando FliC como adjuvante, foi observado um aumento nos níveis de anticorpos IgG séricos e IgA salivares para o fragmento Ag I/II, e uma acentuada diminuição da colonização por *S. mutans* em ratos, demonstrando o potencial protetor desta formulação. Chen et al. (2013) fez uso de

nanopartículas para permitir que as vacinas de DNA pudessem atravessar barreiras fisiológicas levando à possível imunização da mucosa e proteção através de administração intranasal. O sistema de nanopartículas consistia na incorporação de lipossomas aniônicos em complexos de quitosano. Com a captação celular melhorada, as nanopartículas construídas foram capazes de ampliar a imunogenicidade da vacina.

Diferentes estratégias vacinais têm gerado resultados promissores na redução da cárie. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar a imunogenicidade da proteína de superfície BrpA como um possível candidato vacinal. Para tanto, foram investigados a localização de BrpA na bactéria; sua imunogenicidade em modelo murino e a possibilidade de interação da proteína nativa com anticorpos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos:

1) Analisar variações nos padrões de virulência de 24 cepas de *S. mutans* isolados da saliva de crianças com e sem cárie, e 2) Investigar a atividade imunogênica da proteína BrpA como possível candidata vacinal contra *S. mutans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar a correlação entre genes de virulência e características fenotípicas de *S. mutans* isolados de crianças colonizadas por *S. mutans*, com a presença de cárie;

- Investigar a presença dos genes *mut IV* e *brpA* nos isolados de *S. mutans*;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de *S. mutans* obtidos da saliva de crianças com e sem cárie;
- Determinar a tolerância ácida (choque de pH) destes isolados.

2.2.2 Avaliar a localização celular, prevalência e acessibilidade a anticorpos da Proteína Reguladora de Biofilme A (BrpA) em amostras isoladas de *S. mutans* da saliva de crianças com e sem cárie.

- Avaliar a produção de anticorpos em camundongos imunizados com BrpA recombinante;
- Verificar o reconhecimento de extratos de *S. mutans* por anticorpos anti-BrpA;
- Determinar a localização celular de BrpA;
- Investigar a exposição de BrpA na superfície bacteriana pela interação com anticorpos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

As cepas de *S. mutans* utilizadas neste trabalho pertencem ao banco de bactérias do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade São Francisco, e foram isoladas da saliva de crianças com idade entre 6 e 10 anos, com ou sem histórico de cárie, em projeto anterior aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (BALLINI, 2011) (anexo II, página 71, CAAE 007.0.142.000-10). Foram utilizadas 24 cepas de bactéria, sendo 13 provenientes de crianças sem cárie e 11 de crianças com cárie.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade São Francisco (anexo I, página 70) sob o protocolo nº 003.04.2016. Foram utilizados 20 camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 5 e 7 semanas, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados no biotério da Universidade São Francisco em gaiolas coletivas contendo 5 animais cada, e permaneceram por um período de adaptação de no mínimo 5 dias até o início dos experimentos. Durante os experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e alimento e permaneceram em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

3.2 Avaliação da virulência de isolados de *S. mutans*

3.2.1 Análise da presença dos genes *mut IV* e *brpA* nos isolados clínicos de *S. mutans*

A presença dos genes *mut IV* e *brpA* foi detectada por PCR a partir do DNA cromossomal de 24 isolados de *S. mutans* obtidos da saliva de crianças com e sem cárie. A extração de DNA das cepas bacterianas foi realizada com auxílio do kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as condições do fabricante. Ao término da purificação, 100 ng de DNA cromossomal foram utilizados na amplificação dos genes *mut IV* e *brpA*, utilizando-se primers específicos. Um fragmento do gene *gtfB* foi utilizado como controle positivo. As reações foram realizadas em volume final de 50 µL, sendo 1 µL de DNA cromossomal (100 ng), 5 µL de tampão de enzima (10x), 5 µL de MgCl₂ (2,5 nM), 5 µL de dNTPmix (2,5 mM de cada nucleotídeo) 1,5

μL de cada primer (2 nM), 1 μL da enzima Taq DNA polimerase (1 U, Life Technologies) e 30 μL de água milliQ.

As condições de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial de 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação-anelamento-elongação, começando com 30 segundos a 94 °C seguidos por 30 segundos na temperatura de anelamento especificada para cada primer conforme a **TABELA 1** e 1 minuto a 72 °C. Ao término dos ciclos, as amostras foram mantidas por 10 min a 72 °C (Elongação final). A reação foi realizada em termociclador (Gene Amp PCR System 9700AB, Applied Biosystems).

TABELA 1. Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR

Gene	Primers	Tm	pb
<i>mut IV</i>	Sense: 5' ATG GGA TAT TTA AAG GGA AA 3' Anti-sense: 5' TCA GAG CAG CTA CAA AAA CT 3' (QI, CHEN, CAUFIELD, 2001)	51°C	1344
<i>brpA</i>	Sense 5' CTT GAG ATG AAG ATT GGT AAA AAA AT 3' Anti-sense 5' GAA TTC TTA ATT ACC AAT TCC CGT TCC3' (GENEBAN: NP_720858)	59°C	1221
<i>gtfB</i>	Sense 5' CTC GAG ATG CGT GTT GAT AAG TAT GGG ACT 3' Anti-sense 5' GAA TTC TTG AGA TCC TGT CAC TGC TG 3' (JESPERSGAARD et al., 1999)	57°C	871

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 0,8%, e visualizadas sob luz U.V. em foto-documentador (Gel DOC™ XR + Bio Rad). As imagens foram analisadas pelo *software Image Lab*.

3.2.2 Ensaio de formação de biofilme em microplaca

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 foram cultivados em BHI ágar (do inglês *Brain Heart Infusion* - Difco) a 37 °C, em anaerobiose por 16 horas. As colônias foram transferidas para 2 mL de meio BHI líquido e cultivadas nas mesmas condições até atingirem D.O._{600nm} 0,4-0,5. Em seguida, as amostras foram diluídas em meio BHI suplementado com 20% de sacarose até D.O._{600nm} 0,1, transferidas para a microplaca de 96 poços e cultivadas durante 24 horas. Os cultivos foram descartados, e em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS 1x e as células aderidas, coradas com safranina 0,1% durante 15 minutos. Após três novas lavagens com PBS, as células coradas foram ressuspensas pela adição de 125 µL de etanol 100% (Synth) por poço, e a absorbância da solução foi determinada por espectrometria a 495 nm. A comparação entre os grupos com e sem cárie foi realizada pelo teste de Mann Whitney com auxílio do software Graph Prism 5.0.

3.2.3 Teste de tolerância ácida

Para análise da tolerância dos isolados a pH ácido, foi utilizado protocolo descrito por Hanna et al. (2001) e modificado por Nakano et al. (2005). As bactérias foram cultivadas em meio Todd Hewett acrescido de 0,3% de extrato de levedura (THY) a 37 °C durante 16 horas, rediluídas e cultivadas novamente até a fase *midlog* (D.O._{600nm} 0,4-0,5). Os cultivos foram centrifugados a 16.873 x g e os pellets, ressuspensos em meio THY limpo com pH ajustado para 7,5 e 5,0, utilizando-se ácido clorídrico (HCl). Após incubação de 2 horas, as amostras foram novamente centrifugadas, e os pellets, incubados em meio THY limpo com pH ajustado para 3,5, durante 3 horas. Aliquotas dos cultivos antes e depois da incubação em pH 3,5 foram plaqueadas em meio BHI (pH 7,0) em triplicatas, e foi calculada a porcentagem de sobrevivência em relação ao controle (antes da incubação em pH 3,5). As amostras foram comparadas utilizando-se o teste t de student.

3.3 Avaliação imunológica de BrpA

3.3.1 Obtenção da proteína BrpA recombinante

3.3.1.1 Clonagem do gene *brpA* em vetor pAE

O gene *brpA* (número de acesso no GENE BANK: NP_720858) amplificado a partir de uma cepa de *S mutans* isolada de uma criança com cárie (amostra 9) utilizando os primers listados na tabela 1, foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *KpMI* e o produto da digestão foi ligado

ao vetor pAE-6xHis (RAMOS et al., 2004) previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando *pAE-brpA*. Esta construção foi obtida pelo colaborador Rodrigo Cappazoli.

3.3.1.2 Expressão heteróloga do gene *brpA*

A expressão do gene *brpA* foi realizada em *E. coli* BL21(DE3) PlysS quimiocompetente (Life Technologies). A competência e transformação bacterianas foram realizadas conforme protocolo descrito por Sambrook e Green (2012). As bactérias foram transformadas com o vetor *pAE-brpA*. Para a transformação, estoques bacterianos de BL21(DE3) quimiocompetentes mantidos a -80 °C foram descongelados no gelo durante 15 min; em seguida, adicionou-se 1 µL do vetor *pAE-brpA* correspondendo a 400 ng de DNA recombinante, e as amostras permaneceram no gelo por mais 30 min. Foi realizado um choque térmico a 42 °C durante dois min, seguido de nova incubação em gelo durante cinco min. Ao término do processo, as bactérias foram plaqueadas em meio 2YT (16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e 10 g de Agar para 1 Litro de meio), contendo cloranfenicol (50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) e cultivadas a 37 °C durante 16 horas para seleção dos transformantes. Na noite seguinte ao plaqueamento, quatro colônias foram selecionadas para expressão analítica e cultivadas em 5 mL de meio 2YT/amp+clo líquido a 37 °C durante 16 horas, sob agitação. Em seguida, uma alíquota de 200 µL de cada amostra foram transferidos para 5 mL de meio 2YT/amp+clo fresco, e novamente cultivados a 37 °C, sob agitação até D.O._{600nm} entre 0,6 e 0,7. Neste momento, 1 mL de cada amostra foi separado (controle não-induzido) e o restante foi induzido com 1 mM de IPTG durante 3 horas. A análise da expressão foi feita por SDS-PAGE utilizando-se 1 mL dos cultivos induzido e não-induzido. Ao término da indução, as amostras foram centrifugadas a 16.873 x g, ressuspensas em 100 µL de tampão de aplicação (Tris 250 mM, SDS 1%, 0,15g de Azul de bromofenol, 15 mL de glicerol e 2,1 mL de β-mercaptoetanol, em 30 mL de água MilliQ, pH 6,8,) e 10 µL de cada fração das amostras foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. A análise da sequência de aminoácidos da proteína rBrpA pelo programa ExPasy (disponível em <http://expasy.com>) indica uma massa de 43 kDa. Dessa forma, a presença de uma banda com tamanho de 43 kDa na amostra induzida corresponde à rBrpA produzida. A colônia com maior nível de expressão de BrpA foi selecionada e cultivada em 800 mL de meio 2YT líquido. A proteína foi produzida conforme descrito para as

amostras analíticas e, ao término da indução, o cultivo foi centrifugado durante 20 min a 3600 x g, e o pellet armazenado a -20 °C até a purificação das proteínas.

3.3.1.3 Purificação da proteína BrpA recombinante

A purificação da proteína BrpA se deu por cromatografia líquida de afinidade ao Níquel, uma vez que a cauda de 6 histidinas adicionada à proteína pelo vetor possui afinidade a este metal. O pellet dos cultivos induzidos foi descongelado em temperatura ambiente e lisado quimicamente pela adição de 10 mL de B-PER (Novagen) e 10 mL de tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), seguido pela lise mecânica utilizando banho de ultrassom (3 ciclos de 10 min a 40 hertz) (Lavadora Ultra-Sônica Unique - USC - 1600). Após a lise, as amostras foram centrifugadas 2x durante 20 min a 3600 x g e o sobrenadante (Fração Solúvel) foi filtrado em membrana de 0,45 micrômetros e submetido à purificação. A solução foi passada através de uma coluna contendo 5 mL de resina carregada com NiSO₄ (coluna His-Trap, GE-HealthCare) e previamente equilibrada com tampão de equilíbrio. Em seguida, a coluna foi lavada com 50 mL de tampão de equilíbrio contendo 5 mM Imidazol e as proteínas, eluídas em 30 mL de tampão de equilíbrio contendo 300 mM Imidazol e coletadas em tubos de 2 mL. Após nova análise por SDS-PAGE, as amostras positivas (contendo uma banda na altura de 44 kDa) foram unidas (totalizando 20 mL) e dialisadas contra 2 L de PBS 1x durante 2 horas a 4 °C para remoção do Imidazol utilizado na etapa anterior de purificação. Neste processo, foi utilizada membrana de diálise com poro de 3.500 micrômetros (Thermo Fischer). Ao término do processo, as amostras foram aliqüotadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas a -20 °C.

3.3.1.4 Dosagem da proteína BrpA recombinante

A proteína purificada foi dosada através do método de Bradford (Bio- Rad) seguindo-se as especificações do fabricante.

Para a curva padrão foi utilizado BSA (Invitrogen) nas concentrações de 0,5; 1; 2; 3;5 e 7 µg/mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Amersham Biosciences GeneQuant Pro) a 595 nm.

3.3.2 Avaliação da produção de anticorpos em camundongos imunizados com BrpA

3.3.2.1 Esquema de imunização

Para a imunização, 20 animais BALB/c fêmeas com idade entre 5 e 7 semanas foram divididos em dois grupos: 10 animais; o grupo experimental foi imunizado por via subcutânea com três doses de 10 µg de BrpA recombinante (rBrpA) utilizando Al(OH)₃ como adjuvante (100 µg por animal por dose, em um volume final de 200 µL), enquanto o grupo controle (com 10 animais) recebeu apenas adjuvante diluído em solução salina. As imunizações foram feitas com intervalos de 15 dias. Alíquotas de 200 µL de sangue foram coletadas de cada animal pela via retro orbital no dia anterior a cada imunização, e dez dias após a última dose vacinal, para análise da produção de anticorpos (**FIGURA 04**).

O sangue coletado em microtubos foi incubado em estufa por 1 hora a 37°C. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 100 x g, e o soro, transferido cuidadosamente para outro microtubo e armazenado a -20°C.

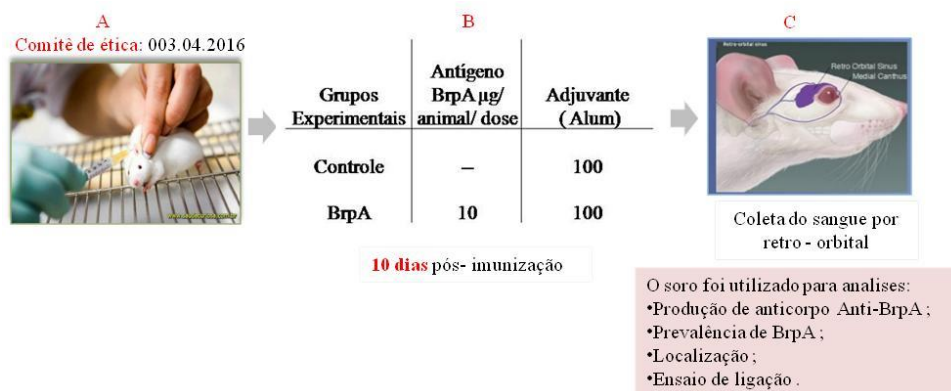


FIGURA 04. Fluxograma do processo de imunização dos camundongos para produção de anticorpos anti-BrpA.(A). Após aprovação do comitê de ética em pesquisa animal da USF, camundongos BALB/c fêmeas de 5 a 7 semanas foram imunizados por via subcutânea. (B) A tabela representa as quantidades de antígeno e adjuvante utilizadas para imunização; cada grupo experimental continha 10 animais. (C). Imagem representa plexo retro-orbital do qual é coletado o sangue para posterior separação de soro utilizado nas demais análises.

3.3.2.2 Dosagem dos anticorpos por ELISA

Os anticorpos anti-BrpA presentes no soro foram quantificados por ELISA. Primeiramente foi realizado o *coating* da placa de ELISA de 96 poços com a proteína rBrpA diluída em tampão

carbonato-bicarbonato (1,59 g de Na₂CO₃, 2,39 g de NaHCO₃ e água até completar 1 L, pH 9,6) concentração de 1 µg/mL. Foram adicionados 100 µL da proteína diluída em cada poço da placa, exceto nos poços que foram utilizados para montar a curva padrão (foram reservados 11 poços para montar a curva). Em seguida, diluiu-se anticorpos IgG total (padrão) a partir da concentração inicial de 2 µg/mL. A placa foi incubada a 4 °C overnight. Ao término desta etapa, a placa foi incubada novamente a 37 °C durante 20 min, e lavada 4 vezes com PBS contendo 0,5% de tween 20 (T20) pH 7,2. Em seguida, foi feito o bloqueio com 200 µL de leite desnatado a 10% em PBS por poço, e a placa foi incubada por mais 30 min a 37 °C. Seguiu-se novo ciclo de lavagens com PBS-T20 em pH 7,2. Analisou-se 10 amostras de soro coletado dos camundongos, que foram diluídas de forma seriada, iniciando-se com o título de 1:20. As placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37 °C, e lavadas 4 vezes com PBS-T20, pH 7,2. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de cabra anti-camundongo IgG (H+)-UNLB, *human-adsorbed* (Southern Biotech) diluído 1:10000 em PBS-BSA 1%, e a placa foi incubada novamente por 1 hora a 37°C e lavada 4 vezes com PBS-T20 pH 7,2. Ao término desta incubação, foi adicionado o anticorpo de coelho marcado com peroxidase, anti-IgG de cabra (H+L) HRP (Southern Biotech) diluído 1:10000 em PBS-BSA 1%, e as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C, e em seguida lavadas 6 vezes com PBS-T20 pH 7,2. Por fim, adicionou-se 100 µL de tampão citrato-fosfato (10,2 g de ácido cítrico, 14,6 g de Na₂HPO₄e água até completar 1 Litro, pH 5,0) acrescido de 5 µL de H₂O₂ e 4 mg de OPD (volume final do tampão = 10 mL), em cada poço. A placa foi então incubada uma última vez durante 10 min, no escuro, em temperatura ambiente. Para parar a reação, cada poço foi completado com 50 µL de ácido sulfúrico a 4 M, e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Asis) com filtro de 492 nm. A análise estatística das leituras foi realizada utilizando-se o teste ANOVA seguido de pós-teste de Tuckey. As análises foram desenvolvidas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos comparando os grupos das imunizações 1 a 3 com o grupo controle, imunizado com adjuvante em solução salina.

3.3.2.3 Análise da reatividade de anticorpos anti-BrpA com extratos de *S. mutans*

A prevalência da proteína BrpA entre isolados de *S. mutans* foi avaliada por western blot de 24 extratos bacterianos contra anticorpos anti-BrpA recombinante, seguindo o protocolo descrito por Goulart et al. (2011). As bactérias foram cultivadas até D.O._{600nm} de 0,6, centrifugadas a 3600

x g durante 5 min, e lavadas duas vezes com 2 mL de PBS. Em seguida as bactérias foram lisadas em banho de ultrassom (Quimis) em 2 ciclos de 10 min a 40 hertz (Lavadora Ultra-Sônica Unique - USC - 1600). Os lisados (extratos bacterianos) foram centrifugados a 3600 x g durante 10 min e o sobrenadante foi coletado e dosado para determinação da concentração de proteínas por Bradford. Amostras contendo 5 µg de proteína total foram submetidas a SDS-PAGE 12% e em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema BioRad, conforme especificações do fabricante. As condições da transferência foram 120 miliampères com voltagem livre durante 90 min, com troca de gelo após 45 min. As membranas foram bloqueadas com solução de 10% de leite desnatado em tampão TBS-T (Tris 100 mM, NaCl 150 mM e 0,05% Tween 20) durante 16 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram incubadas com soro contendo anticorpos anti-BrpA na diluição 1:1000 durante 2 h, lavadas três vezes com 10 mL de tampão TBS-T e incubadas com anticorpo anti mouse IgG na diluição de 1:1000 durante 2 h. Após novas lavagens, a detecção foi realizada utilizando o Kit ECL-Plus (GE Health Care), em filme fotográfico, no escuro.

3.3.3 Determinação da localização bacteriana de BrpA

A análise da localização de BrpA foi realizada por fracionamento celular seguido por western blot das frações, conforme protocolo descrito por (PRICE, CAMILLI, 2009), com alterações. Foram utilizados os isolados 4, 9, 11, 12 e 19 de *S. mutans* e a cepa padrão UA159 (ATCC). Estoques congelados destas bactérias foram cultivados em 3 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion – Difco) a 37 °C durante 16 horas, rediluídos e cultivados novamente em BHI fresco até D.O._{600nm} de 0,6. As amostras foram centrifugadas a 16.873 x g durante 10 min; o sobrenadante dos cultivos foi transferido para um microtubo de 1,5 mL novo e em seguida, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético 6% (TCA) e ressuspendidas em 70 µL de tampão Tris 50 mM (pH 7.5).

Os pellets foram lavados com PBS 1x e ressuspendidos em 70 µL de tampão de digestão de parede celular (coquetel inibidor de protease 1x (Roche), 1 mg/mL de lisozima em solução Tris 10 mM contendo 30% de sacarose, pH 7.5). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 3 h com leve agitação. Os protoplastos foram separados da parede por centrifugação a 16.873 x g por 3 min; o sobrenadante, contendo as proteínas de parede celular, foi transferido para um microtubo de 1,5

mL e armazenado. Os pellets contendo os protoplastos foram ressuspensos em 70 μ L de tampão Tris 50 mM, pH 7.5.

A presença de BrpA foi analisada nas diferentes frações (sobrenadante, protoplasto e parede celular) por western blot utilizando anticorpos anti-BrpA recombinante conforme descrito no item 3.3.3. Foram realizados dois ensaios, utilizando 5 μ g e 40 μ g de proteínas totais de cada fração.

3.3.4 Ensaio de ligação de anticorpos anti-BrpA à superfície de *S. mutans*

A exposição de BrpA na superfície da bactéria foi analisada por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-BrpA recombinante. Isolados de *S. mutans* (amostras 9 e 11) foram cultivados em 5 mL de meio THY (Caldo Todd Hewitt – Difco) até D.O._{600nm} de 0,5. Em seguida, 1 mL do cultivo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 8609 x g durante 4 min. As amostras foram lavadas com PBS 1x e aliqüotadas em tubos contendo 90 μ L de da suspensão bacteriana. Adicionou-se 10 μ L de soro de animais imunizados com BrpA ou adjuvante em solução salina (grupo controle), e as amostras foram incubadas durante 30 min a 37 °C. Após nova lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com 100 μ L de anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (anti-IgG FITC, Sigma), diluído 1:500 em PBS 1x durante 30 min, em gelo e no escuro. Ao término da reação, as bactérias foram ressuspensas em 300 μ L de formaldeído 2 % e armazenadas a 4 °C no escuro. A aquisição dos dados foi realizada em equipamento FACS CANTO II (BD Biosciences), com auxílio do programa Diva, e a análise dos resultados (cálculo da porcentagem de bactérias fluorescentes em cada grupo) foi realizada utilizando-se o programa Flow Jo.

3.4 Análise estatística

Para o ensaio de formação de biofilme em microplaca, a comparação entre os grupos com e sem cárie foi realizada pelo teste de Mann Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Para o teste de tolerância ácida, as amostras foram comparadas utilizando-se o teste t de Student. A produção de anticorpos foi analisada utilizando-se o teste ANOVA seguido de pós teste Tuckey e valores $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

As análises foram realizadas com o auxílio do software Graph Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos fatores de virulência de *S. mutans*

4.1.1 Presença do gene *mut IV*

A prevalência do gene que codifica a mutacina IV (*mut IV*) foi avaliada por PCR, a partir de isolados de *S. mutans* obtidos de crianças com e sem lesões cárias ativas. A **FIGURA 05** mostra a análise por eletroforese em gel dos produtos de amplificação. De um total de 24 amostras de DNA, 14 foram positivas para *mut IV* correspondendo a uma frequência de 58,3%), sendo sete linhagens derivadas de crianças livres de cárie e sete estirpes pertencentes a crianças com cárie. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. A **TABELA 02** resume a frequência total do gene *mut IV* nas amostras bacterianas. Como controle positivo, foi amplificado um fragmento de 871 do gene da glicosiltransferase (*gtfB*) (**FIGURA 06**). Das 24 amostras analisadas, 21 foram positivas para *gtfB*. Os três isolados negativos para *gtfB* foram positivos para *mut IV* ou *brpA*, tendo sido mantidos nas análises como pertencentes à espécie *S. mutans*.

TABELA 02. Prevalência geral do gene *mut IV* em isolados de *S. mutans* obtidos de crianças com e sem cárie.

	Amostras positivas para <i>mut IV</i>	Amostras negativas para <i>mut IV</i>	Total
Livre-cárie	7	6	13
Cárie-ativo	7	4	11
Total	14	10	24
%	58,3	41,7	–

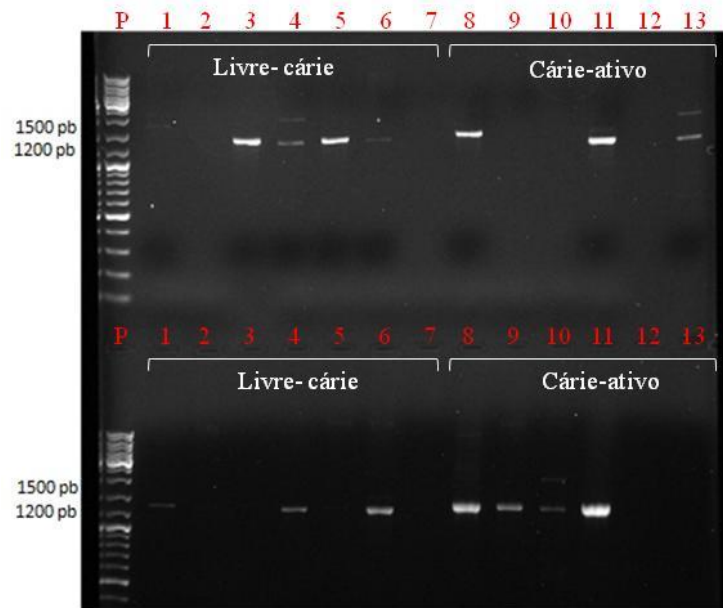


FIGURA 05. Triagem do gene *mut IV* em amostras de *S. mutans*. O gene *mut IV* foi amplificado por PCR de bactérias isoladas de crianças com e sem cárie. As bandas com 1344 pares de bases correspondem ao gene *mut IV*. P, ladder 1 kb plus (Invitrogen).

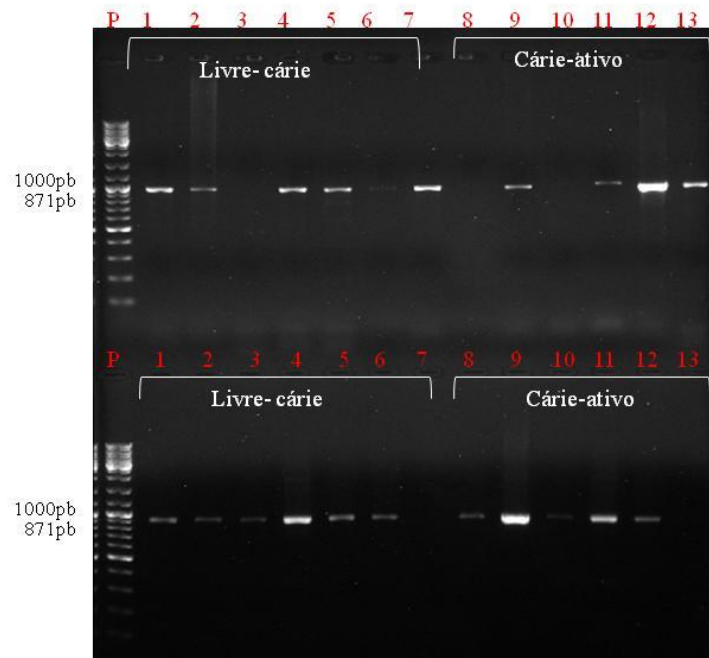


FIGURA 06. Amplificação do fragmento gênico *gtfB* de *S. mutans*. O fragmento de 871 pares de base foi amplificado a partir de 24 amostras de *S. mutans*, por PCR e analisado por eletroforese em gel de agarose. P, ladder 1 kb plus (Invitrogen).

4.1.2 Formação de Biofilme por *S. mutans*

Vinte e quatro isolados de *S. mutans*, obtidos a partir de crianças com cárie (11 isolados) e sem cárie (13 isolados), foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme *in vitro*, através de um ensaio de adesão em placas de poliestireno. A **FIGURA 05** mostra a densidade ótica das bactérias aderidas à placa, nos grupos “sem cárie” e “com cárie”. Não foram observadas diferenças na capacidade de formação de biofilme entre os dois grupos ($p=0,3103$, analisado pelo teste de Mann-Whitney) (**FIGURA 07**).

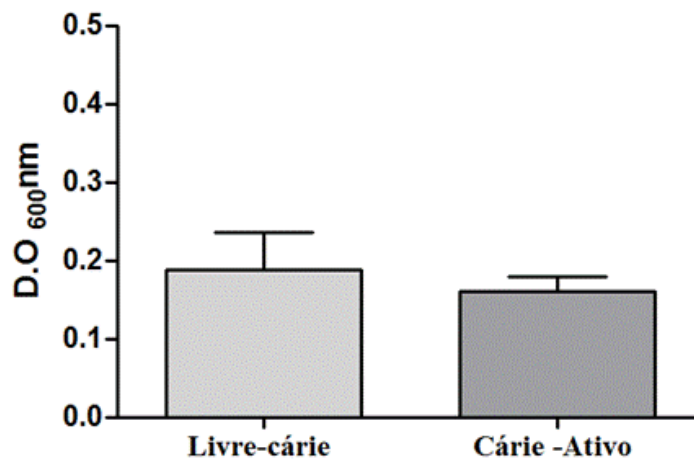


FIGURA 07. Formação de biofilme por cepas de *S. mutans* isoladas de crianças que apresentam e não apresentam cárie. A densidade ótica reflete a quantidade de bactérias aderidas à placa de poliestireno após cultivo em meio contendo sacarose.

4.1.3 Tolerância ácida

A capacidade dos isolados de *S. mutans* de resistir a uma diminuição brusca do pH foi avaliada em comparação com uma diminuição progressiva no pH. Os resultados são mostrados na **FIGURA 08**. Quando as bactérias do grupo sem cárie foram submetidas a uma redução rápida do pH, da neutralidade para pH 3,5 (condição não adaptada), foi observada uma diminuição significativa na viabilidade, em relação a uma redução gradual no pH (de 26% para 4,18% de sobrevivência, $p=0,0017$). Um resultado semelhante foi observado no grupo com cárie; 38% das bactérias sobreviveram à redução gradual no pH, enquanto apenas 5% resistiram à queda brusca no pH ($p=0,0039$). Estes resultados sugerem que, tanto as bactérias do grupo com cárie, quanto aquelas de crianças sem cárie apresentam maior sobrevivência quando submetidas a alterações graduais, do que quando são expostas a alterações drásticas no pH.

No entanto, não foram observadas diferenças na sobrevivência das bactérias isoladas de crianças com e sem cárie para a mesma condição (não adaptada ou adaptada). Embora seja possível observar uma tendência a uma menor sobrevivência no grupo sem cárie na condição adaptada, esta diferença não é significativa ($p=0,07$), indicando que estes dois conjuntos de bactérias têm a mesma tolerância ao desafio ácido.

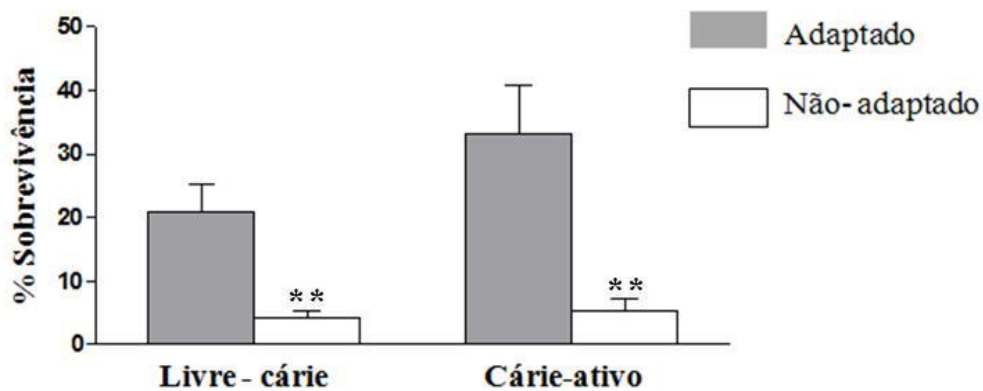


FIGURA 08. Tolerância de *S. mutans* à queda de pH. A sobrevivência dos isolados bacterianos de crianças com e sem cárie foi avaliada nas condições não adaptada (com queda brusca de pH 7,5 para pH 3,5) e adaptada (na qual as amostras passaram por cultura em pH intermediário (pH 7,5 para 5,0 e em seguida para 3,5). ** $p<0,01$ entre condição adaptada e não adaptada.

4.2 Avaliação imunológica de BrpA

4.2.1 Presença do gene *brpA* em isolados clínicos de *S. mutans*.

Para avaliar a prevalência do gene *brpA* nos isolados clínicos de *S. mutans*, 24 estoques bacterianos classificados em Cárie-ativo (11 isolados) e Livre-cárie (13 isolados) tiveram seu DNA cromossomal isolado e utilizado na amplificação gene do *brpA* utilizando primers específicos. Analisando-se a **FIGURA 09**, é possível observar uma banda de 1221 pares de base – correspondente ao gene *brpA* – em 19 dos 24 isolados de *S. mutans*. Essa elevada prevalência foi observada nas bactérias dos grupos com e sem cárie (8 e 11 amostras positivas, respectivamente), sem diferenças significativas entre eles (**TABELA 03**), conforme análise pelo teste de Mann-Whitney.

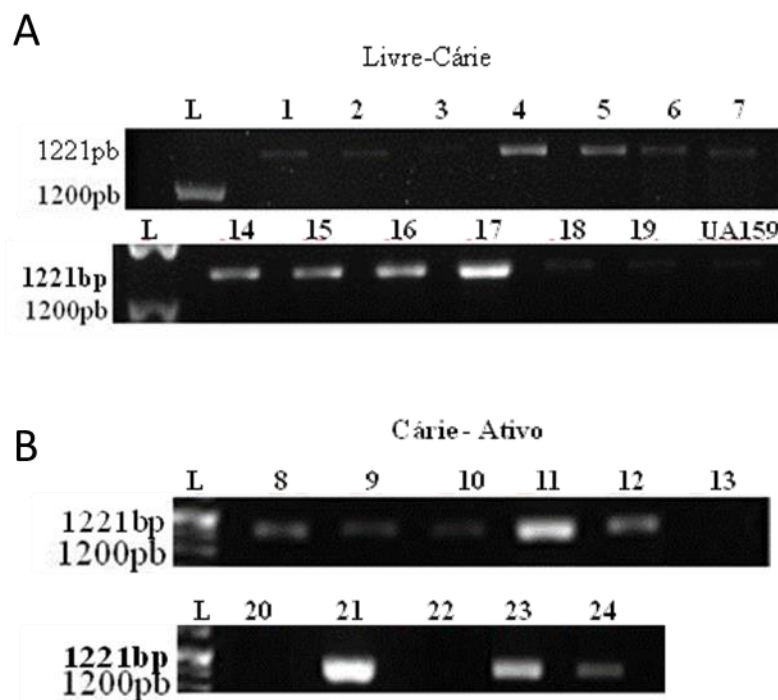


FIGURA 09. Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene *brpA* a partir de amostras de *S. mutans*. A **FIGURA (A)** representa os resultados obtidos para as amostras do grupo livre-cárie e UA159, cepa controle; **(B)** representa os resultados obtidos para as amostras do grupo “Cárie-ativos”.

TABELA 03. Prevalência geral do gene *brpA* em isolados de *S. mutans* obtidos de crianças com e sem cárie.

	Amostras positivas para <i>brpA</i>	Amostras negativas para <i>brpA</i>	Total
Livre-cárie	11	2	13
Cárie-ativo	8	3	11
Total	19	5	24
%	79,2%	20,8	

4.2.2 Clonagem, expressão e purificação de BrpA recombinante

O gene *brpA* amplificado por PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy e subclonado no vetor pAE-6xHis. A presença do gene no vetor recombinante foi confirmada pela digestão dos vetores com a enzima de restrição *EcoRI*. A **FIGURA 10** mostra a análise, por eletroforese, dos fragmentos de DNA gerados pela digestão enzimática dos vetores. É possível observar a presença de uma banda com cerca de 4000 pares de bases nas amostras digeridas (Figura 10, poços 1 e 3), que corresponde ao vetor pAE contendo o gene *brpA*. Em contraste, o vetor pAE vazio, após digestão com a enzima *EcoRI*, apresenta uma banda de 2800 pares de bases (Figura 10, poço 6).

A integridade dos clones foi confirmada por sequenciamento no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

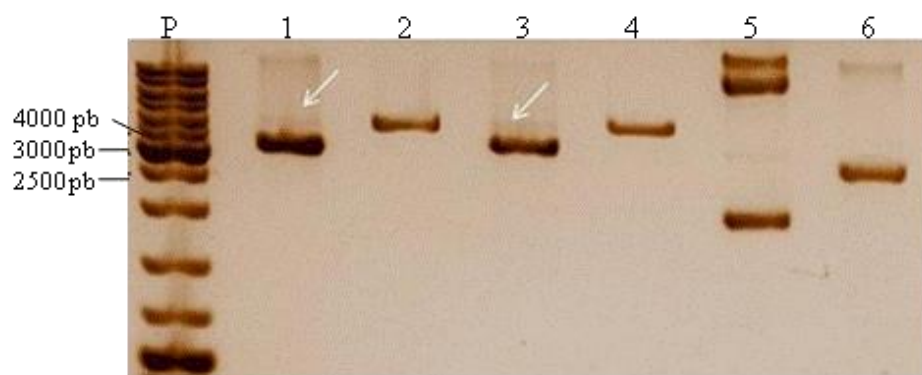


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão do vetor *pAE-brpA* com a enzima de restrição *EcoRI*. P, Padrão ladder 1kb plus (Invitrogen); 1 e 3 *pAE-brpA* linearizado; 2. e 4. *pAE-brpA* fechado; 5. *pAE* vazio fechado e 6. *pAE* vazio linearizado. As setas indicam as bandas correspondentes ao vetor *pAE-brpA* digerido.

4.2.3 Obtenção da proteína BrpA recombinante

O vetor pAE-*brpA* foi inserido por transformação em linhagens de *E. coli* BL21DE3. A expressão do gene foi induzida por IPTG, e as amostras induzida e não induzida foram comparadas por SDS-PAGE, conforme mostrado na **FIGURA 11**. A presença de uma banda majoritária de 43 kDa na fração solúvel da amostra induzida indica que a proteína foi produzida com sucesso em *E. coli*.

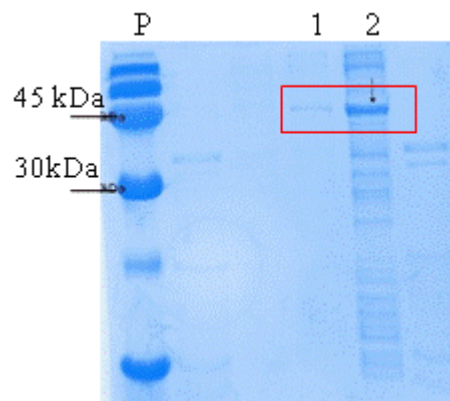


FIGURA 11. Análise da expressão da proteína rBrpA por SDS-PAGE. (≈ 44 kDa). As bactérias foram lisadas com o reagente B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent, a fração solúvel foi separada da fração insolúvel e em seguida foi realizada a purificação. P. Padrão de peso molecular LMW (Ge Health Care); 1. Amostra não induzida - solúvel; 2. Amostra induzida - solúvel.

A proteína rBrpA foi purificada a partir do cultivo induzido, por cromatografia líquida de afinidade ao Níquel. A **FIGURA 12** mostra as frações obtidas durante o processo de purificação. Pode-se observar a presença de uma banda correspondente à BrpA nas frações eluídas. Após a diálise para remoção do imidazol, a dosagem das amostras mostrou que a concentração de rBrpA foi de $1,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, com um rendimento final de 45 mg de proteína por litro de cultivo.

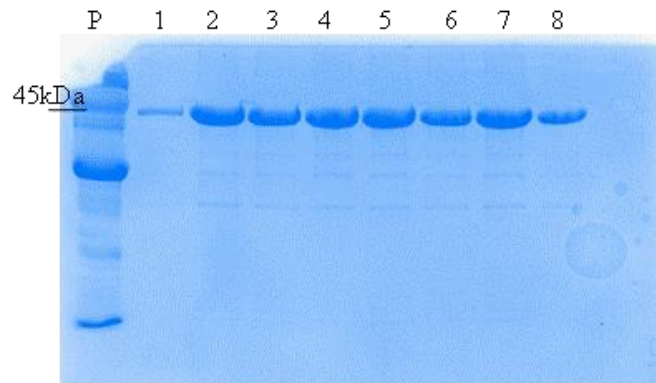


FIGURA 12. Análise por SDS-PAGE da proteína BrpA purificada. A fração solúvel da expressão do gene em *E. coli* foi separada e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel, e as frações provenientes da eluição, analisadas em gel de poliacrilamida. P- Padrão de peso molecular LMW (Ge Health Care); 1 a 8- Eluições da Fração solúvel.

4.2.4 Avaliação da resposta imune humoral induzida em camundongos

A produção de anticorpos no soro de camundongos imunizados com BrpA foi analisada por ELISA, após cada dose vacinal. Os resultados desta análise encontram-se na **FIGURA 13**. É possível observar um aumento na produção de anticorpos específicos após cada uma das três imunizações. A concentração média final foi de 261,57 $\mu\text{g/mL}$ após a terceira dose da vacina.

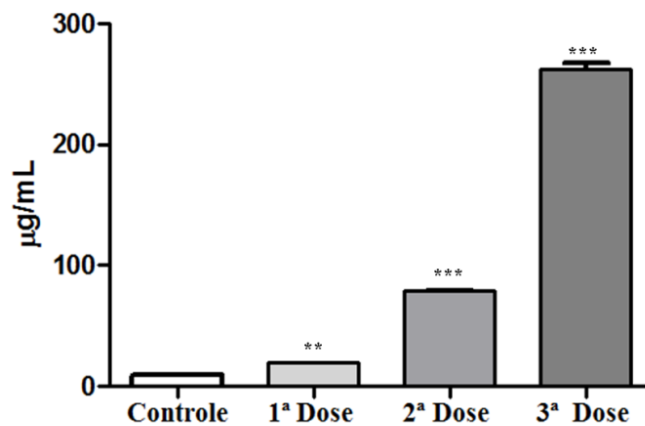


FIGURA 13. Produção de anticorpos anti-BrpA em camundongos. Dez animais foram imunizados com três doses de BrpA pela via subcutânea, e tiveram seu sangue coletado após cada imunização. Os valores correspondem à média da produção de anticorpos nos animais imunizados, em microgramas por mL quando comparados com o grupo controle (animais imunizados com $\text{Al}(\text{OH})_3$ em salina). ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$.

4.2.5 Prevalência da proteína BrpA em isolados de *S. mutans*

A expressão da proteína BrpA nos isolados de *S. mutans* foi analisada por western blot, utilizando-se a proteína recombinante como controle positivo. Na **FIGURA 14**, pode-se observar a expressão de BrpA nos grupos “sem cárie” e “com cárie”. A proteína foi expressa em 11 de 13 amostras do grupo sem cárie (84,6%), e em 7 de 11 amostras do grupo com cárie (63,6%). No total, 18 das 24 amostras de *S. mutans* foram positivas para a expressão de BrpA (75%).

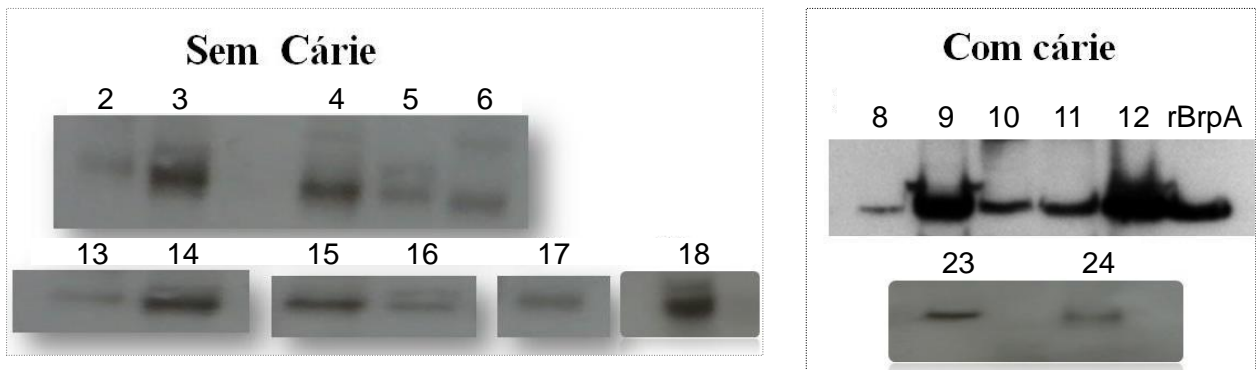


FIGURA 14. Análise por western blot da expressão de BrpA por isolados de *S. mutans*. Extratos bacterianos isolados de crianças com cárie e sem cárie foram analisados na presença de soro anti-BrpA. As bandas com aproximadamente 43 kDa correspondem à proteína BrpA.

4.2.6 Localização de BrpA nos isolados de *S. mutans*

Para análise de localização da proteína BrpA, foram utilizados seis isolados de *S. mutans*: duas cepas obtidas de crianças com cárie (amostras 4 e 19); três de crianças livres de cárie (9, 11, 12) e a cepa padrão UA159, utilizada como controle. A proteína BrpA recombinante também foi incluída como controle positivo. Depois de realizado o fracionamento dos extratos bacterianos, foram obtidas três frações distintas: proteínas exportadas (correspondendo ao sobrenadante dos cultivos), parede celular e protoplasto. As frações foram separadas por SDS-PAGE e analisadas

por western blot contra soro anti-BrpA. Foram realizados dois experimentos distintos, utilizando 5 e 40 microgramas de cada fração protéica.

No primeiro ensaio, foram analisadas três amostras de *S. mutans* (amostras 4, 9 e 11), e 5 microgramas de proteínas totais de cada fração foram utilizados. A cepa padrão UA159 e a proteína rBrpA foram utilizadas como controles positivos. Conforme mostra a Figura 15, é possível observar a presença de BrpA na fração “protoplasto” (fração III) em todas as cepas avaliadas; além disso, também se observa uma banda minoritária na fração “parede celular” (fração II) na amostra 9 e na cepa padrão, UA159.

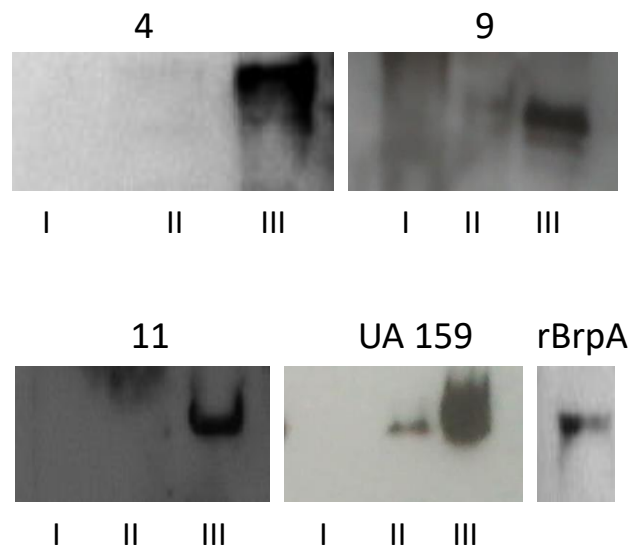


FIGURA 15. Localização de BrpA em frações celulares de *S. mutans*. Cultivos de *S. mutans* (isolados 4, 9, 11 e a cepa padrão UA159) foram fracionados (I) parede celular e (II) protoplasto, e analisados por western blot contra soro anti-BrpA, juntamente com o sobrenadante dos cultivos (III proteínas exportadas). A proteína rBrpA foi utilizada como controle positivo. Foram utilizados 5 μ g de proteínas totais para cada fração.

As análises foram repetidas, desta vez utilizando-se 40 µg de proteínas totais em cada fração, e acrescentando-se as amostras 12 e 19, que também se mostraram positivas para expressão de BrpA. Os resultados desta análise encontram-se na Figura 16.

Observa-se que, ao utilizar uma maior concentração de extrato protéico, é possível detectar BrpA não apenas no protoplasto, como também na parede celular de todos os isolados, sendo também visível no sobrenadante dos cultivos de todas as cepas, exceto a amostra 4.

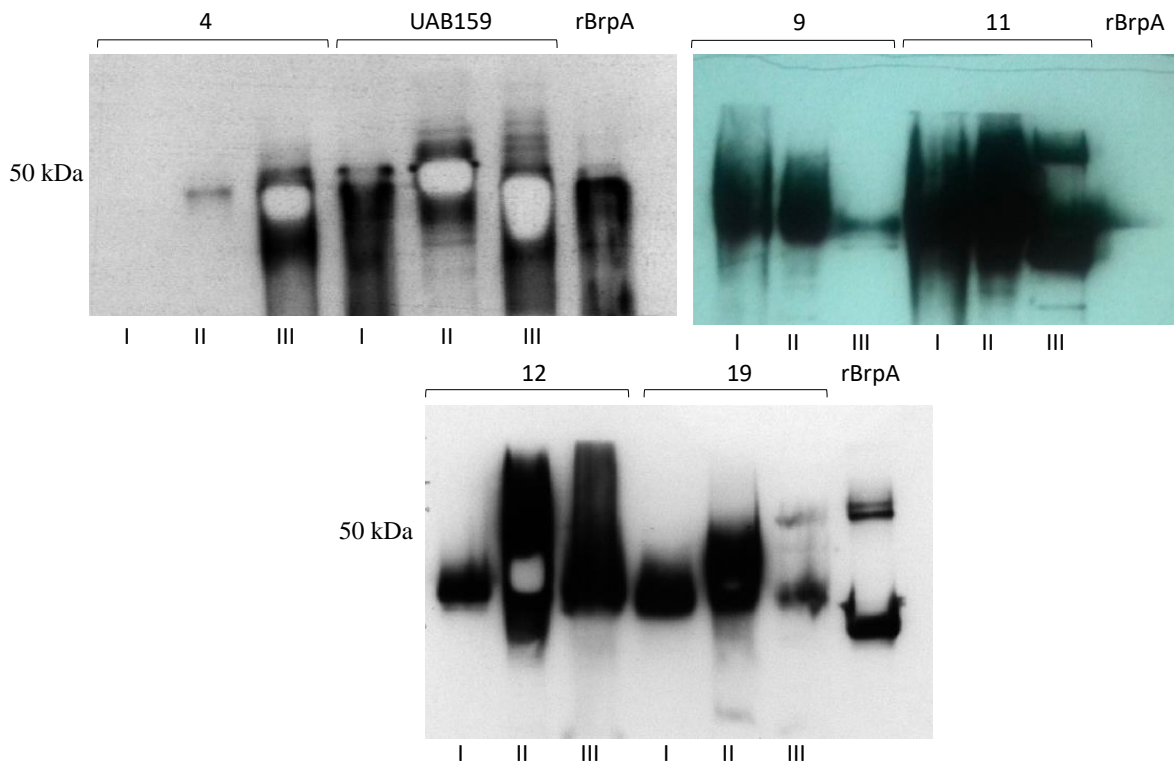


FIGURA 16. Localização de BrpA em frações celulares de *S. mutans*. Cultivos de *S. mutans* (isolados 4, 9, 11 e a cepa padrão UA159) foram fracionados (I) parede celular e (II) protoplasto, e analisados por western blot contra soro anti-BrpA, juntamente com o sobrenadante dos cultivos (III – proteínas exportadas). A proteína rBrpA foi utilizada como controle positivo. Foram utilizados 40 µg de proteínas totais para cada fração.

4.2.7 Ligação de anticorpos anti-BrpA em *S. mutans*

A acessibilidade da proteína BrpA na superfície de *S. mutans* a anticorpos foi avaliada por citometria de fluxo. Dois isolados bacterianos foram incubados na presença de soro anti-BrpA e

anticorpos anti-IgG conjugados com FITC, e a fluorescência das amostras foi determinada por citometria de fluxo. A **FIGURA 17** mostra o histograma da fluorescência dos isolados 9 e 11 após a incubação com o soro anti-BrpA e soro controle. Não foi observado um deslocamento no pico referente aos soros anti-BrpA em relação ao controle, indicando que os anticorpos contra a proteína BrpA não apresentaram ligação à superfície da bactéria.

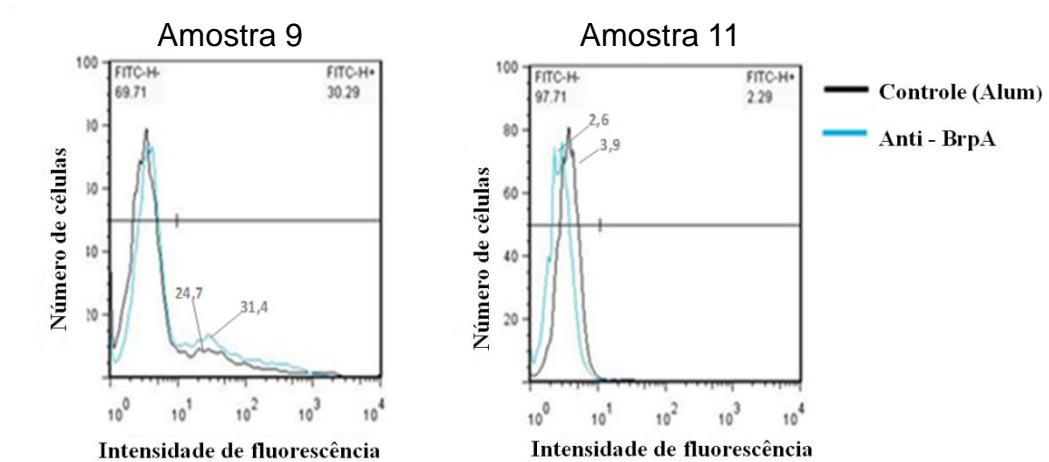


FIGURA 17. Histograma da ligação de anticorpos anti-BrpA à superfície de *S. mutans*. Soro de animais imunizados com a proteína BrpA foi analisado quanto à capacidade de ligação à superfície de dois isolados de *S. mutans* positivos para expressão de BrpA (Amostras 9 e 11).

5. DISCUSSÃO

Embora existam fortes evidências de que *S. mutans* seja o principal agente etiológico da cárie, a composição microbiana da placa bacteriana, a capacidade tamponante da saliva, a ingestão de açúcares, bem como outros fatores socioeconômicos também exercem forte influência sobre o desenvolvimento de lesões cariosas. Considerando o número de indivíduos, as implicações econômicas relacionadas à cárie no mundo hoje, a dificuldade da população em mudar seus hábitos cotidianos a fim de prevenir as lesões cariosas, a vacinação tornou-se uma opção de prevenção contra essa doença, especialmente quando são consideradas crianças muito jovens e de alto risco. (LEITES, PINTO, SOUSA, 2006).

O conceito de vacinação contra a cárie dentária existe desde a descoberta da importância de *S. mutans* na etiologia dessa patologia (RUSSELL et al., 2004). Diferentes estratégias têm sido investigadas, incluindo formulações administradas pela via oral ou sistêmica, e até mesmo a imunização passiva (BALAKRISHNAN, SIMMONDS, TAGG, 2000). A imunização por via subcutânea com *S. mutans*, embora tenha mostrado bons resultados, foi descartada devido à possibilidade desses micro-organismos se alojarem em defeitos cardíacos, culminando em endocardite bacteriana. Por isso, antígenos de superfície celular bem como seus fragmentos recombinantes passaram a ser estudados, como possíveis candidatos vacinais (KOGA et al., 2002).

O presente estudo teve dois objetivos principais: i) avaliar fatores de virulência de *S. mutans* associados à presença de lesões de cárie em crianças e ii) investigar propriedades imunológicas da proteína rBrpA como um possível candidato vacinal contra *S. mutans*.

Na primeira etapa do projeto, 24 cepas de *S. mutans* isoladas de crianças acometidas por cárie ou livres da doença foram analisadas quanto à formação de biofilme, tolerância ao estresse ácido e presença do gene codificante da mutacina IV, uma bactericina. Embora evidências da literatura sugiram que estes fatores possuem um papel preponderante na virulência de *S. mutans*, no presente estudo não foi encontrada associação entre eles e a presença de cáries.

Segundo Napimoga et al. (2004), estudos sobre a correlação dos fatores de virulência desses microrganismos e a diversidade das espécies são fundamentais para entender a colonização de diferentes genótipos no mesmo indivíduo e a expressão de características que podem ou não influenciar sua virulência e capacidade de sobreviver em diferentes condições ambientais. Dois fatores de grande importância em relação à virulência do *S. mutans* e o estabelecimento da cárie

dental são voltados à investigação sobre a capacidade de formação de biofilme e a habilidade tolerância ao meio ácido.

Neste sentido, vários grupos têm analisado as diferenças na capacidade de formar biofilme empregando diferentes metodologias e com resultados contraditórios (WEN, BURNE, 2002; NAKANO et al., 2005; WEN, BAKER, BURNE, 2006). No presente trabalho, foi comparado o potencial de formação de biofilme entre *S. mutans* isolados da saliva de crianças com e sem cárie, utilizando-se um ensaio de adesão em placa dependente de sacarose. Os resultados do presente estudo com relação à formação do biofilme não mostraram diferença estatística significativa entre os grupos cárie-ativo e livre-cárie. Muitos estudos realizados utilizam amostras coletadas diretamente do biofilme dental (SÁNCHEZ-PEREZ, ACOSTA-GÍO, 2001). De acordo com estes estudos, a correlação entre a concentração de estreptococos bucais e a incidência de cárie apresentou uma melhor precisão nas amostras de biofilme do que naquelas obtidas da saliva. Outros autores ainda observaram que a seleção da amostra, biofilme ou saliva, pode afetar a contagem de estreptococos do grupo *mutans* (KÖHLER et al., 1981; BEIGHTON, 1986; BOWEN, 1970).

Segundo Fejerskov e Kidd (2005), as características de micro-organismos organizados em biofilme e crescidos sobre uma superfície são diferentes dos fenótipos expressos pelos mesmos quando estão em uma cultura líquida convencional. Inúmeros trabalhos já demonstraram a associação de *Streptococcus* do grupo *mutans* tanto com o início como com o desenvolvimento de lesões cariosas (DAMLE et al., 2016; MATTOS-GRANER et al., 1998; PARISOTTO et al., 2010; PARISOTTO et al., 2015). Contudo, os níveis desses micro-organismos não pode ser o único fator a ser levado em consideração uma vez que outros, como qualidade e frequência de controle mecânico do biofilme, por exemplo, também podem interferir no estabelecimento da mesma (MATEE et al., 1993). Estes achados podem justificar os resultados encontrados neste estudo, no qual bactérias isoladas de crianças do grupo Livre-cárie também mostraram uma capacidade de formar biofilme como os do grupo Cárie-Ativo.

Segundo Beighton (2005), a cárie ocorre por consequência da interação de vários fatores, além da presença de *S. mutans*, como a relação dinâmica entre consumo de carboidratos e composição e potencial acidogênico do biofilme dental; dessa forma, estudos moleculares visando melhor compreender o metabolismo bacteriano ainda são necessários (DA SILVA et al., 2008).

Para avaliar a capacidade de sobrevivência dos isolados de *S. mutans* dos grupos Cárie-ativo e Livre-Cárie ao choque de pH, os isolados foram desafiados em condições de pH diferentes. Primeiramente foi realizada a comparação entre condição não adaptada (pH 7,5 para pH 3,5 quando os cultivos eram submetidos a uma redução rápida do pH); uma diminuição significativa na sobrevivência das bactérias foi observada nos grupos livres-cárie e cárie-ativos, quando comparados com as amostras cultivadas em condição adaptada (de pH 5,0 para pH 3,5). No segundo momento, não foram observadas diferenças nas cargas bacterianas para a mesma condição (não adaptada ou adaptada), entre as amostras de bactérias de indivíduos cárie-ativos e livres-cárie, sugerindo que estes dois conjuntos de bactérias têm a mesma tolerância ao desafio ácido.

Welin-Neilands e Svensater (2007) avaliaram a sobrevivência de três linhagens de *S. mutans* de indivíduos com cárie ao estresse ácido (quando exposto a valores de pH de 7,5 – 3,5). Primeiramente as linhagens foram cultivadas para possível formação biofilme por 3 horas, em seguida foram realizadas as avaliações. As três linhagens apresentaram uma maior sobrevivência após plaqueamento sob estresse ácido, do que suas respectivas células dispersas do biofilme. Os resultados sugerem que a adesão a uma superfície é um passo importante no desenvolvimento de tolerância ácida em células de biofilme e que diferentes isolados de *S. mutans* possuem diferentes níveis e tolerância às variações ambientais.

Embora avaliação genotípica não tenha sido objetivo deste estudo, dados de literatura relatam a sua influência em relação às diversas características de virulência bacteriana, o que pode ser sugerido como uma possível explicação dos resultados obtidos, (LEMBO et al., 2007) também observou em seus resultados que *S. mutans* exibem intensa diversidade genotípica, mas o papel desta variação ainda é pouco compreendido, uma vez que diferentes clones poderiam apresentar mecanismos diferentes de virulência (GUO et al., 2006; GUO et al., 2008) observaram, através da técnica de RAPD (do inglês *Random Amplification of Polymorphic DNA*), que a placa dentária de 73,3% de 20 indivíduos cárie-ativos de 18 a 29 anos de idade incluía mais de um genótipo de *S. mutans*. Variações significativas no potencial de indução da cárie dentária foram observadas quando comparados genótipos diferentes de *S. mutans* em modelos animais (KOHLENER, KRASSE, 1990). Acredita-se que a capacidade de genótipos específicos competirem com outras linhagens seria essencial para sua colonização (LONGO, MATTOS-GRANER, MAYER, 2003) e, conseqüentemente, alguns genótipos poderiam colonizar o hospedeiro e induzir a cárie dentária

melhor do que outros (KOHLENER, KRASSE, 1990; ALALUUSUA et al., 1996; LEMBO et al., 2007).

Da mesma forma, não foram observadas diferenças na presença do gene *mut IV* entre os isolados de *S. mutans*. No grupo “com cárie”, a presença relativa foi de 63,63%, contra 61,5% no grupo “sem cárie”. Em conjunto, estes dados sugerem que, para este grupo de indivíduos (crianças de 6 a 10 anos) o risco de cárie não parece estar associado aos fatores bacterianos avaliados. Além disso, é possível que outros fatores do hospedeiro (como fatores genéticos e comportamentais), particularmente a ingestão de açúcar, estejam relacionados ao aparecimento de lesões cáries em crianças colonizadas por *S. mutans*.

Segundo Kamiya et al. (2005), em um estudo realizado com amostras de saliva de adultos, quando comparados grupos com e sem cárie, o grupo com cárie demonstrou maior número de isolados de *S. mutans* positivos para o gene *mut IV*. Rodrigues (2007) avaliou a presença de mutacina I; II; III e IV dos *S. mutans* isolados de pré-escolares sem e com cárie dentária. Foi observada a relação positiva entre a presença de mais de um sorotipo bacteriano e mutacina II/IV nos pré-escolares com cárie dentária. Esses resultados sugerem que a alta diversidade genotípica, múltiplos sorotipos e a presença dos genes para mutacinas II e IV têm forte relação com a suscetibilidade à cárie dentária.

Valarini et al. (2009) também observaram a frequência dos genes para mutacina (I, II, III e IV) e sorotipos de antigenicidade *c*, *e*, *f*, em isolados de *S. mutans* em uma população adulta com diferentes níveis de cárie. Verificou-se uma maior proporção de mutacina I, III e IV em *S. mutans* isolados de indivíduos cárie-ativos. O espectro antimicrobiano da mutacina IV inclui especificamente os membros do grupo de *mitis*. De acordo com aquele estudo, a maior complexidade da microbiota bucal encontrada em indivíduos cárie-ativos induz uma maior diversidade na produção de mutacinas por *S. mutans*, que são importantes para o estabelecimento e equilíbrio dessas bactérias em biofilmes, e tornando-os prevalentes na maioria dos sítios orais.

A segunda etapa do projeto consistiu na avaliação da proteína BrpA como um potencial candidato vacinal. Para este fim, o gene *brpA* foi clonado a partir de um isolado de *S. mutans* e expresso em *E. coli*. Este sistema de expressão heteróloga em procariontes tem sido amplamente utilizado para a produção de proteínas bacterianas (PIMENTA et al., 2006, DARRIEUX et al., 2007; FERREIRA et al., 2009). Esta técnica permite a produção da proteína de forma segura, em

quantidades elevadas e com alto grau de pureza. Para o presente estudo, o plasmídeo pAE se mostrou adequado para a expressão da proteína BrpA de forma recombinante.

A presença de rBrpA no extrato proteico induzido foi confirmada pela banda diferenciada na fração solúvel com o tamanho esperado para esta proteína, de aproximadamente 45 kDa. A proteína foi purificada a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade ao Níquel, onde houve a eliminação de grande parte dos contaminantes. O produto final da purificação, rBrpA, foi utilizado para avaliação da resposta imune induzida em camundongos. Após três doses da vacina, foi observado um efeito “*booster*”, caracterizado por um aumento na produção de anticorpos, dose dependente. Este efeito já foi descrito em diversas vacinas baseadas em proteínas, e pode estar associado a um maior potencial protetor.

A imunização sistêmica é uma das formas mais utilizadas de vacinação, induzindo principalmente a formação de IgG e em menor quantidade, IgA e IgM (MIRANDA et al., 2001). Estes anticorpos atingem o fluido da cavidade oral onde podem funcionar em ambos os domínios, gengival e salivar dos dentes (KAUR, GUPTA, SHARMA, 2014).

Uma vez confirmado o potencial imunogênico de BrpA, foi avaliada sua prevalência em diferentes isolados de *S. mutans*, que representa um outro atributo importante para potenciais candidatos vacinais. Das 24 cepas de *S. mutans* utilizadas neste estudo, BrpA foi detectada em 87,5% das amostras por PCR, e 75% por western blot. A presença do gene *brpA*, bem como sua ampla prevalência entre isolados de *S. mutans*, sugerem que esta proteína poderia ser um candidato vacinal promissor. Por fim, foram avaliados dois atributos relacionados à exposição de BrpA na superfície de *S. mutans*: sua localização celular e a acessibilidade a anticorpos.

A análise de localização da proteína BrpA em três diferentes frações dos cultivos bacterianos – sobrenadante de cultura, proteínas de parede e proteínas de protoplasto – mostrou que a proteína é expressa no protoplasto e na parede celular de *S. mutans*, e em 5 isolados também está no sobrenadante da cultura. Apenas no isolado 4 não houve a presença da proteína BrpA na fração “sobrenadante de cultura”. Estes resultados sugerem que a proteína BrpA está localizada nas camadas mais superficiais da célula bacteriana, e pode estar acessível à interação com o sistema imune. A fim de confirmar esta hipótese, foi realizado um ensaio de ligação de anticorpos à superfície bacteriana. Neste ensaio, foi avaliada a interação do soro anti-rBrpA com *S. mutans* em cultura. Nenhuma das duas cepas avaliadas apresentou reconhecimento por anticorpos anti-BrpA,

sugerindo que esta proteína não está acessível para interação com o sistema imune do hospedeiro. No entanto, algumas limitações do ensaio devem ser apontadas, como a ausência de um controle (proteína que interage com anticorpos na superfície bacteriana), além do número reduzido de isolados analisados. Dessa forma, uma investigação mais aprofundada deve ser realizada a fim de esclarecer a acessibilidade da proteína BrpA nativa no reconhecimento por anticorpos.

Ainda que seja interessante que antígenos vacinais estejam expostos na superfície bacteriana, a ausência de ligação dos anticorpos anti-BrpA aos isolados de *S. mutans* não é necessariamente um empecilho para sua utilização como antígeno vacinal. Seu papel central na formação do biofilme e sobrevivência de *S. mutans* em condições adversas (acidez, estresse oxidativo) sugerem que BrpA é um forte candidato para inclusão em uma vacina contra esta bactéria. Porém, uma investigação mais aprofundada do potencial protetor de BrpA se faz necessária a fim de confirmar sua possível utilização como vacina.

Apesar dos inúmeros estudos que buscam compreender a etiologia da cárie dentária e os métodos de controle e prevenção da mesma, procedimentos odontológicos adequados (como a remoção do biofilme cariogênico) e a adequação da dieta, ainda são os métodos preventivos mais utilizados (TINANOFF, 2002). Neste contexto, a possibilidade do desenvolvimento de vacinas efetivas contra cárie dental tem atraído atenção considerável ao longo dos anos (TAUBMAN, NASH, 2006). Diversas limitações importantes ainda precisam ser resolvidas antes da implementação de uma vacina contra cárie. Contudo, os resultados têm se mostrado promissores nos estudos em animais, estimulando a busca por uma maior compreensão dos fatores que influenciam no desenvolvimento da cárie, bem como das respostas imunológicas na mucosa em humanos, aumentando assim a possibilidade de se desenvolver uma vacina segura e eficaz.

O principal alvo das pesquisas tem se concentrado no mecanismo de aderência do *S. mutans* mediados, por exemplo, por proteínas de membrana, o complexo de enzimas glicosiltransferase, e proteínas ligantes de glucanos (MICHALEK, CHILDERS, 1990), antígeno D, antígeno III, antígeno A, antígeno C e antígeno B (P1) (YAMASHITA, TAKEHARA, KURAMITSU, 1993; KOGA et al., 1995; BRADY et al., 2010). Foi demonstrado que anticorpos contra a proteína P1 inteira e até mesmo fragmentos desta proteína bloqueiam a adesão, inibindo a colonização pelo *S. mutans* (SHIVAKUMAR, VIDYA, CHANDU, 2009; BRADY et al., 2010).

Considerando os resultados promissores com vacinas baseadas em antígenos de superfície em modelos animais, a combinação de um ou mais destes antígenos com BrpA poderia ampliar a eficácia protetora, uma estratégia interessante na prevenção da cárie, por não depender de fatores inerentes aos hábitos e educação do hospedeiro.

6. CONCLUSÃO

- A análise de formação de biofilme *in vitro* realizada não apresentou diferença significativa entre os grupos Livre-cárie e Cárie-ativo.
- A avaliação da tolerância ácida apresentou diferença quando comparada a redução brusca de pH (não adaptada) e com a redução gradual do pH (condição adaptada).
- Não foram observadas diferenças na presença do gene *mut IV* (que codifica a mutacina IV) entre os isolados de *S. mutans* de crianças com e sem cárie.
- A imunização de camundongos com BrpA recombinante induziu a produção de anticorpos específicos de maneira dose dependente.
- A análise da presença do gene *brpA* mostrou uma prevalência de 87,5% entre os isolados, enquanto a proteína BrpA foi expressa em 75 % das bactérias.
- A proteína BrpA foi localizada no protoplasto e parede celular das bactérias, sendo também encontrada no sobrenadante dos cultivos em cinco dos seis isolados analisados.
- Os anticorpos anti-BrpA não apresentaram ligação à superfície das bactérias, sugerindo que a proteína não está acessível ao sistema imune.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALUUSUA, S.; MATTO, J.; GRONROOS, L.; INNILA, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch. Oral. Biol.**, v. 41, n. 2, p. 167-173, 1996.

ALBINO, J.; TIWARI, T. Preventing Childhood Caries: A Review of Recent Behavioral Research. **J. Dent. Res.**, v. 95, n. 1, p. 35-42, 2016.

ANS. **Planos odontológicos: evolução, desafios e perspectivas para a regulação da saúde suplementar**. Rio de Janeiro, 2009. 139 p.

BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R. S.; TAGG, J. R. Dental caries is a preventable infectious disease. **Aust. Dent. J.**, v. 45, n. 4, p. 235-245, 2000.

BALLINI, M. B. **Estudo de fatores de virulência de *S. mutans* e componentes da saliva na susceptibilidade à cárie em crianças**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2011.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 1267-1277, 2004.

BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, n. 2, p. 89-99, 2003.

BANU, L. D.; CONRADS, G.; REHRAUER, H.; 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.**, v. 78, n. 5, p. 2209-2220, 2010.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dent. Oral. Epidemiol.**, v. 33, n. 4, p. 248-255, 2005.

BITOUN, J. P.; NGUYEN, A. H.; FAN, Y.; BURNE, R. A.; WEN, Z. T. Transcriptional repressor Rex is involved in regulation of oxidative stress response and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 320, n. 2, p. 110-117, 2011.

BITOUN, J. P.; LIAO, S.; MCKEY, B. A.; YAO, X.; FAN, Y.; ABRANCHES, J.; BEATTY, W. L.; WEN, Z. T. Psr is involved in regulation of glucan production, and double deficiency of BrpA and Psr is lethal in *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 493-506, 2013.

BITOUN, J. P.; LIAO, S.; YAO, X.; AHN, S. J.; ISODA, R.; NGUYEN, A. H.; BRADY, L. J.; BURNE, R. A.; ABRANCHES, J.; WEN, Z. T. BrpA is involved in regulation of cell envelope stress responses in *Streptococcus mutans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 8, p. 2914-2922, 2012.

- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.
- BRADY, L. J.; MADDOCKS, S. E.; LARSON, M. R.; FORSGREN, N.; PERSSON, K.; DEIVANAYAGAM, C. C.; JENKINSON, H. F. The changing faces of Streptococcus antigen I/II polypeptide family adhesins. **Mol. Microbiol.**, v. 77, n. 2, p. 276-286, 2010.
- CASCAES, A. M., CAMARGO, M. B. J., CASTILHOS, E. D., SILVA, A. E. R., BARROS, A. F. D. Gastos privados com saúde bucal no Brasil: análise dos dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009. **Cad. Saúde Pública**, v. 32, n. 1, epub. 00148915, 2017.
- 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.**, v. 72, n. 1, p. 37-45, 1993.
- CHATFIELD, C. H.; KOO, H.; QUIVEY, R. G.; Jr. The putative autolysin regulator LytR in Streptococcus mutans plays a role in cell division and is growth-phase regulated. **Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 625-631, 2005.
- CHEN, L.; ZHU, J.; LI, Y.; LU, J.; GAO, L.; XU, H.; FAN, M.; YANG, X. Enhanced nasal mucosal delivery and immunogenicity of anti-caries DNA vaccine through incorporation of anionic liposomes in chitosan/DNA complexes. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71953, 2013.
- CONRADS, G.; DE SOET, J. J.; SONG, L.; HENNE, K.; SZTAJER, H.; WAGNER-DOBLER, I.; ZENG, A. P. Comparing the cariogenic species Streptococcus sobrinus and S. mutans on whole genome level. **J. Oral Microbiol.**, v. 3, n. 6, p. 26189, 2014.
- COSTA, S. D. M.; ABREU, M. H. N. G. D.; VASCONCELOS, M.; LIMA, R. D. C. G. S.; VERDI, M.; FERREIRA, E. F. Desigualdades na distribuição da cárie dentária no Brasil: uma abordagem bioética. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 2, p. 461-470, 2013.
- CURY, J. A.; FRANCISCO, S. B.; DEL BEL CURY, A. A.; TABCHOURY, C. P. In situ study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. **Braz. Dent. J.**, v. 12, n. 2, p. 101-104, 2001.
- CVITKOVITCH, D. G.; LI, Y. H.; ELLEN, R. P. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 11, p. 1626-1632, 2003.
- DA SILVA, A. C.; CRUZ JDOS, S.; SAMPAIO, F. C.; DE ARAUJO, D. A. Detection of oral streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 648-651, 2008.
- DARRIEUX, M.; MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, L. M.; LOPES, A. P.; REN, B.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; LEITE, L. C. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against Streptococcus pneumoniae that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 12, p. 5930-5938, 2007.

DASANAYAKE, A. P.; CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; STILES, H. M. Transmission of mutans streptococci to infants following short term application of an iodine-NaF solution to mothers' dentition. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 21, n. 3, p. 136-142, 1993.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DREAMSTIME **Cárie e cavidade do dente**. Disponível em <https://pt.dreamstime.com/ilustrao-stock-crie-e-cavidade-do-dente-image60470307>. Acesso em: 12 de agosto de 2016.

EKSTRAND, K. R.; KUZMINA, I.; BJORNDAL, L.; THYLSTRUP, A. Relationship between external and histologic features of progressive stages of caries in the occlusal fossa. **Caries Res.**, v. 29, n. 4, p. 243-250, 1995.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. A. M. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**, 1. ed. Santos, 2005. 352 p.

FERREIRA, D. M.; DARRIEUX, M.; SILVA, D. A.; LEITE, L. C.; FERREIRA, J. M.; Jr.; HO, P. L.; MIYAJI, E. N.; OLIVEIRA, M. L. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 5, p. 636-645, 2009.

FREIRE, M. C. M.; REIS, S. C. G. B.; FIGUEIREDO, N.; PERES, K. G.; MOREIRA, R. S.; ANTUNES, J. L. F. Determinantes individuais e contextuais da cárie em crianças brasileiras de 12 anos em 2010. **Rev. Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 40-49, 2013.

FUJIWARA, T.; SASADA, E.; MIMA, N.; OOSHIMA, T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 19, n. 3, p.151-154, 1991.

GAMBHIR, R. S.; SINGH, S.; SINGH, G.; SINGH, R.; NANDA, T.; KAKAR, H. Vaccine against Dental Caries- An Urgent Need. . **Journal of Vaccines Vaccin**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2012.

GOLDBERG, M.; KULKARNI, A. B.; YOUNG, M.; BOSKEY, A. Dentin: structure, composition and mineralization. **Front. Biosci. (Elite Ed.)**, v. 1, n. 3, p. 711-735, 2011.

GOULART, C.; DARRIEUX, M.; RODRIGUEZ, D.; PIMENTA, F. C.; BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE, A. L.; LEITE, L. C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1634-1642, 2011.

GRONROOS, L.; MATTO, J.; SAARELA, M.; LUOMA, A. R.; LUOMA, H.; JOUSIMIES-SOMER, H.; PYHALA, L.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S. Chlorhexidine susceptibilities of

mutans streptococcal serotypes and ribotypes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 4, p. 894-898, 1995.

GUO, L.; SHI, W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. **J. Calif. Dent. Assoc.**, v. 41, n. 2, p. 107-109, 112-108, 2013.

GUO, L. H.; WANG, H. L.; LIU, X. D.; DUAN, J. Identification of protein differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by proteomic analysis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 105-111, 2008.

GUO, L. H.; SHI, J. N.; ZHANG, Y.; LIU, X. D.; DUAN, J.; WEI, S. Identification of genetic differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by suppression subtractive hybridization. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, n. 6, p. 372-380, 2006.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, v. 44, n. 2, p. 331-384, 1980.

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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 343, n. 3, p. 787-792, 2006.

HANNA, M. N.; FERGUSON, R. J.; LI, Y. H.; CVITKOVITCH, D. G. *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 20, p. 5964-5973, 2001.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H. K.; SONG, Z. J.; MOSER, C.; JENSEN, P. O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. **Int. J. Oral Sci.**, v. 3, n. 2, p. 55-65, 2011.

HUBSCHER, J.; LUTHY, L.; BERGER-BACHI, B.; STUTZMANN MEIER, P. Phylogenetic distribution and membrane topology of the LytR-CpsA-Psr protein family. **BMC Genomics**, v. 19, n. 9, p. 617, 2008.

JENSEN, M. E.; SCHACHTELE, C. F. The acidogenic potential of reference foods and snacks at interproximal sites in the human dentition. **J. Dent. Res.**, v. 62, n. 8, p. 889-892, 1983.

JESPERSGAARD, C.; HAJISHENGALLIS, G.; GREENWAY, T. E.; SMITH, D. J.; RUSSELL, M. W.; MICHALEK, S. M. Functional and immunogenic characterization of two cloned regions of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase I. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 2, p. 810-816, 1999.

KAMIYA, R. U.; NAPIMOGA, M. H.; HOFLING, J. F.; GONCALVES, R. B. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. **J. Med. Microbiol.**, v. 54 n. 6, p. 599-604, 2005.

KAUR, A.; GUPTA, N.; SHARMA, S. Immunology of dental caries and caries vaccine - Part I. **Int. J. Pharm. Biol. Sci.**, v. 4, n. 4, p. 131-136, 2013.

KAUR, A.; GUPTA, N.; SHARMA, S. Immunology of dental caries and caries vaccine - Part II. **Int. J. Pharm. Biol. Sci.**, v. 5, n. 1, p. 3-8, 2014.

KLEIN, M. I.; HWANG, G.; SANTOS, P. H.; CAMPANELLA, O. H.; KOO, H. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Front Cell Infect. Microbiol.**, v. 5, n. 10, p. 1-8, 2015.

KOGA, T.; OHO, T.; SHIMAZAKI, Y.; NAKANO, Y. Immunization against dental caries. **Vaccine**, v. 20, n. 16, p. 2027-2044, 2002.

KOGA, T.; YAMASHITA, Y.; NAKANO, Y.; KAWASAKI, M.; OHO, T.; YU, H.; NAKAI, M.; OKAHASHI, N. Surface proteins of Streptococcus mutans. **Dev. Biol. Stand.**, v. 85, p. 363-369, 1995.

KOHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 177-180, 1990.

KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **J. Dent. Res.**, v. 92, n. 12, p. 1065-1073, 2013.

LAMONT, R.; LANTZ, M.; BURNE, R.; LEBLANC, D. **Oral microbiology and immunology**. 1. ed. ASM PRESS, 2006. 482 p.

LEHNER, T.; RUSSELL, M. W.; WILTON, J. M.; CHALLACOMBE, S. J.; SCULLY, C. M.; HAWKES, J. E. Passive immunization with antisera to Streptococcus mutans in the prevention of caries in rhesus monkeys. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 107, p. 303-315, 1978.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. S. Asp ctos microbiol gicos da c rie dental. **Salusvita**, v. 25, n. 2, p. 239-252, 2006.

LEMBO, F. L.; LONGO, P. L.; OTA-TSUZUKI, C.; RODRIGUES, C. R.; MAYER, M. P. Genotypic and phenotypic analysis of Streptococcus mutans from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 5, p. 313-319, 2007.

LEMONS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by Streptococcus mutans. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3247-3255, 2008.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 2, p. 681-685, 1995.

LIF HOLGERSON, P.; OHMAN, C.; RONNLUND, A.; JOHANSSON, I. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0128534, 2015.

LIMA, J. E. O. C rie dentária: um novo conceito. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial**, v. 2, n. 6, p. 119-130, 2007.

LOESCHE, W. J.; STRAFFON, L. H. Longitudinal investigation of the role of Streptococcus mutans in human fissure decay. **Infect. Immun.**, v. 26, n. 2, p. 498-507, 1979.

- LONGO, P. L.; MATTOS-GRANER, R. O.; MAYER, M. P. Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in Streptococcus mutans genotypes from caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 18, n. 3, p. 144-149, 2003.
- LOPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 7, p. a000398, 2010.
- MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Med. Chem.**, v. 5, n. 6, p. 517-528, 2009.
- MANJI, F.; FEJERSKOV, O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 2, p. 733-741, 1990.
- MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dent. Clin. North Am.**, v. 43, n. 4, p. 599-614, 1999.
- MARSH, P. D.; MARTIN, M. **Oral Microbiology**, 4. ed. London: Wright/Elsevier Health Sciences, 1992.
- MICHALEK, S. M.; CHILDERS, N. K. Development and outlook for a caries vaccine. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 1, n. 1, p. 37-54, 1990.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil entra no grupo de países com baixo índice de cárie na população.** Disponível em <http://www.brasil.gov.br/saude/2010/12/brasil-entra-no-grupo-de-paises-com-baixo-indice-de-carie-na-populacao-diz-saude>. Acesso em 14 de outubro de 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais.** Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 116 p.
- 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. Sao Jose Campos**, v. 4, n. 1, p. 67-76, 2001.
- NAKANO, K.; FUJITA, K.; NISHIMURA, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Contribution of biofilm regulatory protein A of Streptococcus mutans, to systemic virulence. **Microbes Infect.**, v. 7, n. 11-12, p. 1246-1255, 2005.
- NAPIMOGA, M. H.; KAMIYA, R. U.; ROSA, R. T.; ROSA, E. A.; HOFLING, J. F.; MATTOS-GRANER, R.; GONCALVES, R. B. Genotypic diversity and virulence traits of Streptococcus mutans in caries-free and caries-active individuals. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, n. 7, p. 697-703, 2004.
- OPPERMANN, R. V.; WEIDLICH, P.; MUSSKOPF, M. L. Periodontal disease and systemic complications. **Braz. Oral Res.**, v. 26, n. 1, p. 39-47, 2012.
- PACHECO, F. C. Imunologia da Cavidade Oral. In: _____. Fundamentos de Imunologia. Lidel - Edições Técnicas, 2007.

- PARROT, M., CAUFIELD, P. W., LAVOIE, M. C. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. **Can. J. Microbiol.** 36(2): 123-130, 1990.
- PETERSON, S. N.; SNESRUD, E.; SCHORK, N. J.; BRETZ, W. A. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. **Int. Dent. J.**, v. 61, n. 1, p. 11-22, 2011.
- PIMENTA, F. C.; MIYAJI, E. N.; AREAS, A. P.; OLIVEIRA, M. L.; DE ANDRADE, A. L.; HO, P. L.; HOLLINGSHEAD, S. K.; LEITE, L. C. Intranasal immunization with the cholera toxin B subunit-pneumococcal surface antigen A fusion protein induces protection against colonization with *Streptococcus pneumoniae* and has negligible impact on the nasopharyngeal and oral microbiota of mice. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 8, p. 4939-4944, 2006.
- PRICE, K. E.; CAMILLI, A. Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 7, p. 2163-2168, 2009.
- QI, F.; CHEN, P.; 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.**, v. 67, n. 1, p. 15-21, 2001.
- RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; 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.**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.
- RODRIGUES, M. R. **Avaliação da diversidade genotípica, sorotipos e mutacina em *Streptococcus mutans* isolados em pré-escolares com diferentes experiências de cárie.** 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2007.
- ROSA, R. T.; GONÇALVES, R. B.; ROSA, E. A. R. Transmissibilidade de estreptococos cariogênicos: uma atualização conceitual **Rev. Clín. Pesq. Odontol.**, v. 1, n. 4, p. 27-37, 2005.
- 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.**, v. 38, n. 3, p. 230-235, 2004.
- SALLI, K. M.; OUWEHAND, A. C. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. **J. Oral Microbiol.**, v. 7, 26149, 2015.
- SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 4. ed. N.Y.: Cold Spring Harbor, 2012. 1890 p.
- SANCHEZ-PEREZ, L.; ACOSTA-GIO, A. E. Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture media. **Arch. Oral Biol.**, v. 46, n. 1, p. 49-55, 2001.
- SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiol Rev.**, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

- SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51-59, 2007.
- SHI, W.; LI, Y. H.; LIU, F.; YANG, J. Y.; ZHOU, D. H.; CHEN, Y. Q.; Zhang, Y.; Yang, Y.; He B. X, Han, C.; Fan, M. W.; Yan, H. M. Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-caries DNA vaccine. **J. Dent. Res.**, v. 91, n. 3, p. 249-254, 2012.
- SHIBATA, Y.; OZAKI, K.; SEKI, M.; KAWATO, T.; TANAKA, H.; NAKANO, Y.; YAMASHITA, Y. Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 9, p. 4107-4112, 2003.
- SHIVAKUMAR, K. M.; VIDYA, S. K.; CHANDU, G. N. Dental caries vaccine. **Indian J. Dent. Res.**, v. 20, n. 1, p. 99-106, 2009.
- SIMMONDS, R. S.; TOMPKINS, G. R.; GEORGE, R. J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. **N. Z. Dent. J.**, v. 96, n. 424, p. 44-49, 2000.
- SKUCHA-NOWAK, M.; GIBAS, M.; TANASIEWICZ, M.; TWARDAWA, H.; SZKLARSKI, T. Natural and Controlled Demineralization for Study Purposes in Minimally Invasive Dentistry. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v. 24, n. 5, p. 891-898, 2015.
- SMITH, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, n. 4, p. 335-349, 2002.
- SMITH, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Expert Rev. Vaccines**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2010.
- SMITH, D. J.; MATTOS-GRANER, R. O. Secretory immunity following *mutans streptococcal* infection or immunization. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 319, p. 131-156, 2008.
- TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 3, p. 294-303, 2011.
- TANNER, A. C.; KENT, R. L.; Jr.; HOLGERSON, P. L.; HUGHES, C. V.; LOO, C. Y.; KANASI, E.; CHALMERS, N. I.; JOHANSSON, I. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 11, p. 1298-1305, 2011.
- TAUBMAN, M. A.; NASH, D. A. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 7, p. 555-563, 2006.
- TINANOFF, N. Caries management in children: decision-making and therapies. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 23, n. 12, p. 9-13, 2002.
- VALARINI, N.; PIOVEZAN, A.; BRAGA, M. P.; MACIEL, S. M.; FERREIRA, F. B. A.; POLI-FREDERICO, R. C. Análise genético-molecular dos genes para sorotipo e mutacina em *Streptococcus mutans* em uma população adulta. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 11, n. 3, p. 13-16, 2009.

- VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. Dent. J.**, v. 30, n. 4, p. 305-326, 1980.
- WELIN-NEILANDS, J.; SVENSATER, G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 17, p. 5633-5638, 2007.
- WEN, Z. T.; BURNE, R. A. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 3, p. 1196-1203, 2002.
- WEN, Z. T.; BAKER, H. V.; BURNE, R. A. Influence of BrpA on critical virulence attributes of *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 8, p. 2983-2992, 2006.
- WEN, Z. T.; YATES, D.; AHN, S. J.; BURNE, R. A. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 111, 2010.
- WEST, N. X.; JOINER, A. Enamel mineral loss. **J. Dent.**, v. 42, n. 1, p. S2-11, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION Methods . **Oral health surveys: basic methods**. Disponível em www.who.int/oral_health/publications/9789241548649/en/. Acesso em 14 de outubro de 2016.
- XU, H.; HAO, W.; ZHOU, Q.; WANG, W.; XIA, Z.; LIU, C.; CHEN, X.; QIN, M.; CHEN, F. Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89269, 2014.
- YAMASHITA, Y.; TAKEHARA, T.; KURAMITSU, H. K. Molecular characterization of a *Streptococcus mutans* mutant altered in environmental stress responses. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 19, p. 6220-6228, 1993.
- YAMASHITA, Y.; TSUKIOKA, Y.; NAKANO, Y.; TOMIHISA, K.; OHO, T.; KOGA, T. Biological functions of UDP-glucose synthesis in *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 144, n. 5, p. 1235-1245, 1998.
- ZHANG, X.; YANG, S.; LIAO, Z.; XU, L.; LI, C.; ZENG, H.; SONG, J.; ZHANG, L. Prevalence and care index of early childhood caries in mainland China: evidence from epidemiological surveys during 1987-2013. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 18897, 2016.

ANEXOS

Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – Animal



COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA



Bragança Paulista, 28 de Abril de 2016

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação Da Resposta Imunologica Contra a Proteína Brpa de Streptococcus Mutans

ÁREA DE CONHECIMENTO: IMUNOLOGIA

Autor(es): Profa. Dra. MICHELLE DARRIEUX SAMPAIO BERTONCINI;ELOÁ RAMALHO DE CAMARGO;JONAS BITENCOURT CANALLE;MARGARET BULHMAN BALLINI.

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 003.04.2016

IP. CIUCA: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA N°: 01.0226.2014

Vigência do Projeto: 01/08/2011 a 30/06/2016

Número de Animais/Espécie: 20 camundongos Balb/c

isogênicos fêmea Total de Animais: 20 camundongos isogênicos

Procedência do Animal: Biotério da Faculdade de Medicina da USP

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa– CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 28/04/2016 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

Mário Angelo Claudino

**Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco**

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambui
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambui - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

Anexo II: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – Humano

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, aceitando 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) 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

APÊNDICE

Apêndice I: Artigo aceito para publicação

Contribution of *Streptococcus mutans* virulence factors and host immune response to caries susceptibility in children

Eloa Ramalho de Camargo*, Jonas Bitencourt Canalle*, Rodrigo Capozzoli, Irina Turcanu, Tanila Wood dos Santos, Margareth Bulhman Ballini, Lucio Fabio Caldas Ferraz and Michelle Darrieux[§]

Laboratório de Biologia Molecular e Farmacologia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

[§]Corresponding author

Email address: sampaiomichelle@uol.com.br

1. Abstract

1.1. Background

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* in 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.

1.2. Methods

Saliva samples of 24 children (13 caries-free and 11 caries-active individuals) were collected and tested for their ability to agglutinate *S. mutans*. The bacteria were isolated from these samples and analyzed for the presence of the gene coding for mutacin IV. Biofilm formation and acid tolerance were also investigated in both groups (caries-free and caries-active).

1.3. Results

Saliva samples from caries-free children showed an increased capacity to agglutinate *S. mutans*. Also, bacteria isolated from the caries-free group formed less biofilm when compared to the caries-active group. The presence of mutacin IV gene did not differ between bacteria isolated from caries-free and caries-active individuals, nor did the ability to tolerate an acidic environment, which was the same for the two groups.

1.4. Conclusions

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.

Keywords: *Streptococcus mutans*, caries, mutacin, biofilm.

Apêndice II: Artigo submetido

Cellular Localization, prevalence and antibody accessibility of Biofilm Regulator Protein A (BrpA) from *Streptococcus mutans*

Jonas Bitencourt Canalle^{1*}, Eloa Ramalho de Camargo^{1*}, Thiago Rojas Converso², Rodrigo Capozzoli¹, Thais Manzano Parisotto¹ Lucio Fabio Caldas Ferraz¹ and Michelle Darrieux^{1§}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, Brazil.

²Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email address:sampaiomichelle@uol.com.br

Universidade São Francisco – Laboratório de Biologia Molecular e Farmacologia

Av São Francisco de Assis, 218 Bragança Paulista – SP Brazil

Phone: +5501124548054

2. ABSTRACT

Streptococcus mutans plays an important role in caries development, due to its ability to produce and tolerate an acidic environment, and the capacity to form biofilms on the tooth. Many proteins have been investigated as vaccine candidates against *S. mutans*, particularly those involved in bacterial adhesion and biofilm formation. Biofilm regulator protein A is virulence factor necessary for biofilm accumulation and for maintenance of envelope integrity. Bioinformatics analysis suggests that BrpA is a transmembrane protein; however, the cellular location of BrpA has not been experimentally investigated. The present study determined BrpA location, together with

other traits associated with its potential for inclusion in a vaccine against *S. mutans*, i.e. immunogenicity, prevalence among clinical isolates and accessibility to interact with antibodies. The results indicate the BrpA is localized more internally in the bacterial membrane and is not exposed on the surface. Although it is desirable that potential vaccine candidates are readily available for interaction with the immune system, we cannot exclude the use of BrpA or BrpA negative mutants in caries vaccines.

Keywords: *Streptococcus mutans*, BrpA, recombinant protein, antibody, vaccine, caries.

- 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**, v. 72, n. 1, p. 37-45, 1993.
- DAMLE, S.G.; LOOMBA, A.; DHINDSA, A.; LOOMBA, A.; BENIWAL, V. Correlation between dental caries experience and mutans streptococci counts by microbial and molecular (polymerase chain reaction) assay using saliva as microbial risk indicator. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 13, n. 6, p. 552-559, 2016.
- GOULART, C.; DARRIEUX, M.; RODRIGUEZ, D.; PIMENTA, F.C.; BRANDILEONE, M.C.; DE ANDRADE, A.L.; LEITE, L.C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1634-1642, 2011.
- KOGA, T.; OHO, T.; SHIMAZAKI, Y.; NAKANO, Y. Immunization against dental caries. **Vaccine**, v. 20, n. 16, p. 2027-2044, 2002.
- LAW, V.; SEOW, W.K.; TOWNSEND, G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. **Aust Dent J**, v. 52, n. 2, p. 93-100; quiz 159, 2007.
- 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**, v. 32, n. 5, p. 319-323, 1998.
- PARISOTTO, T.M.; STEINER-OLIVEIRA, C.; DUQUE, C.; PERES, R.C.; RODRIGUES, L.K.; NOBRE-DOS-SANTOS, M. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. **Arch Oral Biol**, v. 55, n. 5, p. 365-373, 2010.
- PARISOTTO, T.M.; STIPP, R.; RODRIGUES, L.K.; MATTOS-GRANER, R.O.; COSTA, L.S.; NOBRE-DOS-SANTOS, M. Can insoluble polysaccharide concentration in dental plaque, sugar

exposure and cariogenic microorganisms predict early childhood caries? A follow-up study. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 8, p. 1091-1097, 2015.

SMITH, D.J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Expert Rev Vaccines**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2010.