



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Paula Pereira Zenaro

Influência do peróxido de hidrogênio na formação e virulência de biofilmes de
Streptococcus mutans

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Paula Pereira Zenaro

**Influência do peróxido de hidrogênio na formação e virulência de biofilmes de
*Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara

2018

Zenaro, Paula Pereira

Influência do peróxido de hidrogênio na formação e virulência de biofilmes de *Streptococcus mutans* / Paula Pereira Zenaro. – Araraquara: [s.n.], 2018

63 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Peróxido de hidrogênio 2. *Streptococcus mutans* 3. Biofilmes
4. Fatores de virulência I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Paula Pereira Zenaro

**Influência do peróxido de hidrogênio na formação e virulência de biofilmes de
*Streptococcus mutans***

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Presidente e orientador: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

3º Examinador: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça

Araraquara, 26 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

PAULA PEREIRA ZENARO

NASCIMENTO: 29/03/1990, São José do Rio Pardo/SP

FILIAÇÃO: Walter Zenaro Junior
Ângela Maria Bernadete Pereira Zenaro

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

2010-2015 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

2016-2018 Curso de Pós- Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Dedico este trabalho...

Primeiramente a **Deus**, por zelar dos planos da minha vida, pelas oportunidades que me concedeu, por sempre guiar meus passos, nunca me abandonando nos momentos de dúvida. Por me permitir conhecer e conviver com pessoas muito especiais que me fizeram crescer e aprender muito durante essa etapa.

Aos meus pais, **Walter e Ângela**, por confiarem em mim, acreditando nos meus sonhos, e tornando cada etapa possível de ser vivenciada. Por me ensinarem a colocar Deus em primeiro lugar na minha vida, e acreditar que sem Ele nada sou. Por me darem amor e carinho de forma a me encorajar a conquistar meus objetivos.

Ao meu irmão **Walter** e a minha irmã **Mariana**, que sempre se fizeram presentes em todos os momentos, me incentivando e me dando forças, e não medindo esforços para me ajudarem. Aqueles com quem me identifico e me espelho, que são uma parte de mim, que estão no meu coração aonde quer que eu vá.

Ao meu namorado e amigo, **Rodolfo**, que nunca me deixou desistir, que acredita em mim, que me engrandece e luta comigo. Aquele que me apoia e me motiva a ser melhor a cada dia.

A toda minha **família**, aqueles que já se foram, que tenho certeza que do céu olham por mim. E aos que de perto torcem, rezam, e que de alguma forma sempre se fizeram presentes durante toda minha caminhada.

AMO MUITO CADA UM DE VOCÊS!

Agradecimentos Especiais

A **Deus**, por ter me proporcionado tantas oportunidades e por me dar saúde, sabedoria e discernimento para vivê-las.

As pessoas mais importantes da minha vida, meus queridos e amados pais, **Walter e Ângela**, que tornaram possível a conclusão de mais esta etapa de minha formação. Obrigada por todo incentivo, torcida e o apoio nos momentos difíceis. Agradeço muito por sonharem comigo, e tornarem tudo possível. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. A vocês devo tudo! Vocês são a minha base e meus grandes exemplos de vida! Hoje, esta conquista é nossa!

Aos meus amados irmãos **Walter e Mariana**, que me inspiram. São exemplos de profissionais e pessoas que lutam e acreditam no outro. Pessoas com as quais cresci e aprendi muito, devo muito a vocês. Obrigada por me apoiarem e não me deixarem desistir nos momentos difíceis, vocês são tudo para mim. Amo-os infinitamente.

Aos meus cunhados **Vinicius e Raquel**, que sei que torceram e rezaram por mim, e aceitaram dividir meus irmãos comigo nos momentos que mais precisei. Sou muito grata por tudo.

Ao meu príncipe de verdade, **Rodolfo**, meu namorado e amigo, que sempre me apoiou em cada decisão, me deu força e me fez acreditar em mim mesma. Aquele que me dá esperanças e me mostra o lado bom de cada coisa. Você é minha força e minha calma. Te amo muito, obrigada por tanto e por tudo.

A minha orientadora, **Profa. Dra Elisa Maria Aparecida Giro**, agradeço, primeiramente, por acreditar e confiar em mim para a execução deste trabalho. Jamais esquecerei todos os ensinamentos, aprendi muito como pessoa e profissional. Agradeço por estar sempre presente e dispensar de tempo, paciência e atenção. Muito obrigada por aceitar esse desafio de ser minha orientadora, por ao longo dessa caminhada ter se tornado uma amiga, e por nunca medir esforços para me ajudar. Tia Elisa, obrigada pela parceria, por ser um grande exemplo para mim, me ensinando

sempre a trabalhar com respeito e amor. Tenho grande admiração pela Senhora, principalmente por toda a dedicação e carinho com os nossos pacientes especiais. Meu coração se enche de alegria e gratidão por tudo!

A querida **Profa. Dra Marlise Inêz Klein Furlan**, por sempre estar disponível a me ensinar e me ajudar em cada detalhe da minha pesquisa. Por ser exemplo de professora e pesquisadora, e por sempre me colocar para cima, mostrando acreditar em mim e no meu trabalho. Sou grata a Senhora por ter contribuído tanto para que tudo desse certo. Obrigada por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, por todo o apoio e confiança em mim depositados.

Agradeço aos meus padrinhos **Fátima e Roque, Regina e Toninho**, que sempre participaram da minha formação, fizeram e fazem muito por mim. Amo vocês!

A minha família araraquarense, minhas amigas desde a faculdade **Thaís Sampaio e Maíra Lache**, que tornaram meus fardos mais leves, me ajudaram a passar pelos momentos mais difíceis, me apoiando e me dando força. Obrigada por cada conversa, cada risada, por ser casa, coração e amizade. Amo vocês!

As minhas companheiras de casa **Natália, Vitória e Thainá**, que me acolheram de forma tão carinhosa e companheira, que me entenderam e respeitaram minhas velhices, e que foram ombro amigo muitas vezes. Vou sentir saudades, tenho um carinho enorme por vocês.

Enfim, agradeço **a toda minha família e amigos**, que torcem, rezam, acreditam e participam de cada conquista da minha vida, sei que se fui capaz de chegar até aqui é porque nunca estive só, sempre tive quem me apoiou e me ajudou a enxergar além. Vocês foram essenciais, amo vocês.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representada pela digníssima diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgaviolli Massucato e pela vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Aos professores da banca examinadora, **Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan e Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça**, por aceitarem prontamente o meu convite. Fico honrada em tê-los presentes na minha defesa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP coordenado pela **Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti**.

Aos docentes da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fabiano Jeremias, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Fernanda Lourenção Brighenti, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

À **Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti**, agradeço por todo o apoio dado quando necessário, por sua contribuição em meu trabalho, e por sempre dispor de tempo e paciência para comigo.

Às companheiras e amigas, **Yasmin Albuquerque, Juliana Sardella, Aline Farias, Ana Carolina de Oliveira Becci** por todo o tempo disponibilizado em me ajudar e ensinar algumas técnicas laboratoriais. Sou grata a cada uma de vocês.

À querida técnica **Gabriela Pereira** que me ensinou cada detalhe do laboratório, me ajudou, tirou minhas dúvidas, não me deixou desistir, esteve comigo durante a fase mais difícil da pesquisa, teve paciência e não duvidou da minha capacidade. Obrigada por tudo, e principalmente pela amizade.

Ao **Laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica**, do departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, coordenado pela Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação: Alexandre e Cristiano** por toda atenção, apoio, suporte e disponibilidade em ajudar.

Aos **funcionários do Departamento de Clínica Infantil**, Dulce, Soninha, Flávia, Diego, Totó, Pedrinho, pessoas por quem tenho muito carinho.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Aos meus colegas de pós-graduação, **Isadora, Juliana, Lana, Rafael, Thamyris** agradeço por todos os nossos momentos juntos, pela amizade e companheirismo e por todo o carinho. Vou sentir saudades.

Aos meus **pacientes e seus cuidadores**, meus pequenos amados, e os especiais tão queridos, obrigada pela confiança em mim depositada. Vocês tornaram essa caminhada leve e gostosa de ser vivida, vocês são o meu motivo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, colaboraram para a execução desta pesquisa.

Muito obrigada!

Zenaro PP. Influência do peróxido de hidrogênio na formação e virulência de biofilmes de *Streptococcus mutans* [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é considerado uma das principais fontes endógenas de estresse oxidativo para bactérias orais. Contudo, o seu papel no processo de desenvolvimento da cárie dentária ainda não está completamente elucidado. O objetivo deste estudo *in vitro* foi gerar uma cepa de *Streptococcus mutans* tolerante ao H_2O_2 , e avaliar a habilidade do H_2O_2 em afetar a formação e a virulência de biofilmes de *S. mutans*. Para gerar a cepa tolerante ao H_2O_2 , a cepa de *S. mutans* UA159, foi reativada em placas de agar BHI e incubadas (48 horas, a $37^\circ C$ e 5% de CO_2). Duas a cinco colônias foram transferidas para tubos falcon contendo 2 mL de caldo BHI suplementado com 1% de glicose e incubadas por 18 horas, sob as mesmas condições. As culturas foram diluídas 1:20 em meio de cultura fresco, incubadas até atingirem a fase exponencial de crescimento, centrifugadas, lavadas, ressuspensas em glicina, e submetidas a tratamento com 80 mM de H_2O_2 . Esses procedimentos foram repetidos por oito vezes, e as colônias sobreviventes foram consideradas tolerantes. Em seguida, para o crescimento do biofilme, foi usado um modelo de aderência ativa. Lamínulas de vidro estéreis, jateadas com óxido de alumínio, foram imersas em saliva filtrada para a formação da película adquirida. Posteriormente, foram imersas verticalmente em 2,8 mL de caldo BHI com 1% de sacarose ($n=12$ por grupo) inoculado com 10^6 UFC/mL da cepa controle (grupo GC) ou da cepa tolerante ao H_2O_2 . Para a cepa tolerante ao H_2O_2 , em um grupo (grupo GTcPH) foram acrescentados 80 mM de H_2O_2 ao meio de cultura e, no outro (grupo GTsPH), os micro-organismos cresceram em meio de cultura semelhante ao do grupo GC. As placas foram incubadas a $37^\circ C$ com 5% de CO_2 por 5 dias e o meio de cultura foi renovado diariamente. Em seguida, a suspensão bacteriana obtida dos biofilmes foi usada para a contagem de micro-organismos, dosagem de polissacarídeos insolúveis em água e quantificação de proteína total. O meio de cultura foi usado para avaliação do pH e da concentração de ácido láctico. Os dados de contagem de micro-organismos do biofilme, os valores de pH do meio e a concentração de ácido láctico foram analisados pelo teste ANOVA com correção de Welch, seguido do pós teste de Games-Howell para dados heterocedásticos. Para o peso seco do biofilme, concentração de proteínas e quantificação de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água, foram analisados apenas os grupos GC e GTsPH. No grupo GTcPH o biofilme formado foi insuficiente para a realização dessas análises. A distribuição dos dados foi normal e houve homogeneidade de variâncias, sendo aplicado o teste *t* de Student. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%. A contagem de UFC no biofilme foi significativamente menor apenas no grupo GTcPH ($p<0,001$). Este grupo mostrou valores de pH significativamente maiores que os grupos GC e GTsPH ($p<0,001$). A concentração de ácido láctico foi maior em GC, seguido pelos grupos GTsPH e GTcPH, tendo o último produzido a menor quantidade do ácido láctico ($p<0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GC e GTsPH para peso seco do biofilme e concentração de proteínas ($p\geq 0,051$). A concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água foi significativamente maior no grupo GC em relação ao grupo GTsPH ($p=0,040$). Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que a cepa tolerante ao

H₂O₂ apresentou uma diminuição na expressão de fatores de virulência quando cultivada tanto na presença quanto na ausência do H₂O₂.

Palavras – chave: Peróxido de hidrogênio. Streptococcus mutans. Biofilmes. Fatores de virulência.

Zenaro PP. Influence of hydrogen peroxide on the formation and virulence of *Streptococcus mutans* biofilms [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of the main endogenous sources of oxidative stress for oral bacteria. However, its role in the dental caries development has not been fully elucidated. The objective of this *in vitro* study was to generate a strain of *S. mutans* tolerant to H_2O_2 , and to evaluate the ability of H_2O_2 to affect the biofilm formation and virulence of *S. mutans*. To generate the H_2O_2 tolerant strain, *S. mutans* UA159 was reactivated on BHI agar plates, and incubated (48 hours at 37 °C and 5% CO_2). Two to five colonies of the microorganism were transferred to falcon tubes containing 2 mL of BHI broth supplemented with 0.8% glucose and incubated under the same conditions for 18 hours. The culture was diluted 1:20 in fresh culture medium, incubated again until reaching the mid-log growth phase, centrifuged, washed, suspended in glycine, and treated with 80 mM H_2O_2 . These procedures were repeated for eight times, and then the surviving colonies were considered tolerant. Next, the biofilm were grown on glass slides using an active adherence model. First, sterile glass slides, sandblasted with aluminum oxide, were immersed in filtered saliva to form the acquired pellicle. After that, the slides were immersed vertically in 2.8 mL of BHI broth with 1% sucrose (n = 12 per group) and inoculated with 10^6 CFU/mL of the control strain (GC Group) or H_2O_2 tolerant strain. For the H_2O_2 tolerant strain, in a group (GTcPH group) 80 mM H_2O_2 were added in the culture medium and in the other group (GTsPH group) microorganisms grown in culture medium similar to that used for the GC group. The plates were incubated (37 °C, 5% CO_2) for five days and the culture medium was renewed daily. Then, the suspension of bacteria obtained from the biofilm was used for microorganisms counting, dosing of water insoluble extracellular polysaccharides, dry-weight, CFU and total protein. The culture medium was used to evaluate pH and lactic acid concentration. The CFU counts, pH of the medium and lactic acid concentration were analyzed by ANOVA with Welch correction, followed by Games-Howell post-test for heterocedastic data. For biofilm dry weight, protein concentration and quantification of water insoluble extracellular polysaccharides, only GC and GTsPH were analyzed. In GTcPH group, the biofilm formed was insufficient to perform these analyzes. Data distribution was normal and there were homogeneity of variances, so *Student's t-test* was applied. The significance level established for all tests was 5%. CFU counts in the biofilm were significantly lower in the GTcPH group ($p < 0.001$). This group showed significantly higher pH values than the GC and GTsPH groups ($p < 0.001$). The lactic acid concentration was higher in GC, followed by GTsPH and GTcPH, the latter group having produced the lowest amount of lactic acid ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference between the GC and GTsPH groups for dry weight of the biofilm and protein concentration ($p \geq 0.051$). The concentration of water insoluble extracellular polysaccharides was significantly higher in CG than in GTsPH ($p = 0.040$). Therefore the hydrogen peroxide tolerant strain showed a decrease in the expression of virulence factors when cultivated both in the presence and in absence of hydrogen peroxide.

Keywords: Hydrogen peroxide. *Streptococcus mutans*. Biofilms. Virulence factors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	09
2 PROPOSIÇÃO.....	12
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 Síndrome de Down / Estresse Oxidativo/ Prevalência de Cárie Dental.....	13
3.2 Biofilme Dental: Papel de <i>Streptococcus mutans</i> no Desenvolvimento da Cárie.....	19
3.3 Peróxido de Hidrogênio: Importante Fonte Endógena de Estresse Oxidativo para Bactérias Orais	29
4 MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 Obtenção de Cepa de <i>S. mutans</i> Tolerante ao Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	33
4.2 Crescimento dos Biofilmes de <i>Streptococcus mutans</i>	37
4.3 Processamento dos Biofilmes.....	38
4.3.1 Contagem de micro-organismos do biofilme	39
4.3.2 Análise da concentração de ácido láctico	40
4.3.3 Análise bioquímica.....	40
4.3.3.1 Determinação do peso seco insolúvel e dosagem de polissacarídeos extracelulares (EPS) insolúveis em água.....	40
4.3.3.2 Quantificação de proteínas	42
4.4 Análise Estatística	42
5 RESULTADO.....	44
5.1 Obtenção <i>S. mutans</i> Resistentes ao Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	44
5.2 Análise Microbiológica e Bioquímica do Biofilme	46
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE.....	59
ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

A microbiota oral é um sistema biológico de alta complexidade, com elevada densidade celular e uma vasta diversidade de espécies microbianas¹. Muitas dessas espécies se organizam de acordo com o espaço e com o tempo formando biofilmes que as tornam mais resistentes aos diversos fatores de estresse presentes nesse *habitat*^{2,3}.

Na superfície dentária, os micro-organismos se organizam numa matriz extracelular complexa⁴ e as interações que ocorrem entre eles podem influenciar a composição do biofilme de forma a mantê-lo em um estado homeostático, ou causar o desenvolvimento de patologias, como a cárie dentária e a doença periodontal⁵. No biofilme supragengival, já foram identificadas mais de 450 espécies de micro-organismos⁶, sendo o gênero *Streptococcus* predominante no estágio inicial de colonização^{2,7}. A colonização inicial proporciona uma superfície adequada para a colonização secundária⁸, e determinadas condições, como uma dieta rica em sacarose, favorecem o desenvolvimento de biofilmes com maiores proporções de bactérias acidogênicas e ácido tolerantes, como *Streptococcus mutans*.

Streptococcus mutans é um componente regular do biofilme dental maduro⁹, e essa espécie tem sido considerada um relevante agente microbiano na patogênese da cárie dentária^{10,11}. A geração de ácidos por este micro-organismo faz com que o biofilme dental atinja baixos valores de pH, resultando na desmineralização do esmalte dentário e início da formação de lesões de cárie^{10,11}.

Assim, substâncias com a capacidade de interferir na adesão dos colonizadores iniciais, e de limitar o aumento em número de algumas espécies bacterianas no biofilme constituem uma estratégia interessante para evitar a instalação e desenvolvimento da cárie dentária. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma espécie reativa de oxigênio responsável por estresse oxidativo e dano no biofilme dental e tem um papel importante na ecologia deste¹². O H₂O₂ em baixas concentrações (cerca de 16,6 mM) inibe a glicólise e age como bacteriostático para *S. mutans*, enquanto concentrações elevadas (acima de 30 mM) têm ação bactericida por causarem danos irreversíveis às estruturas responsáveis pela síntese proteica desses micro-organismos¹³.

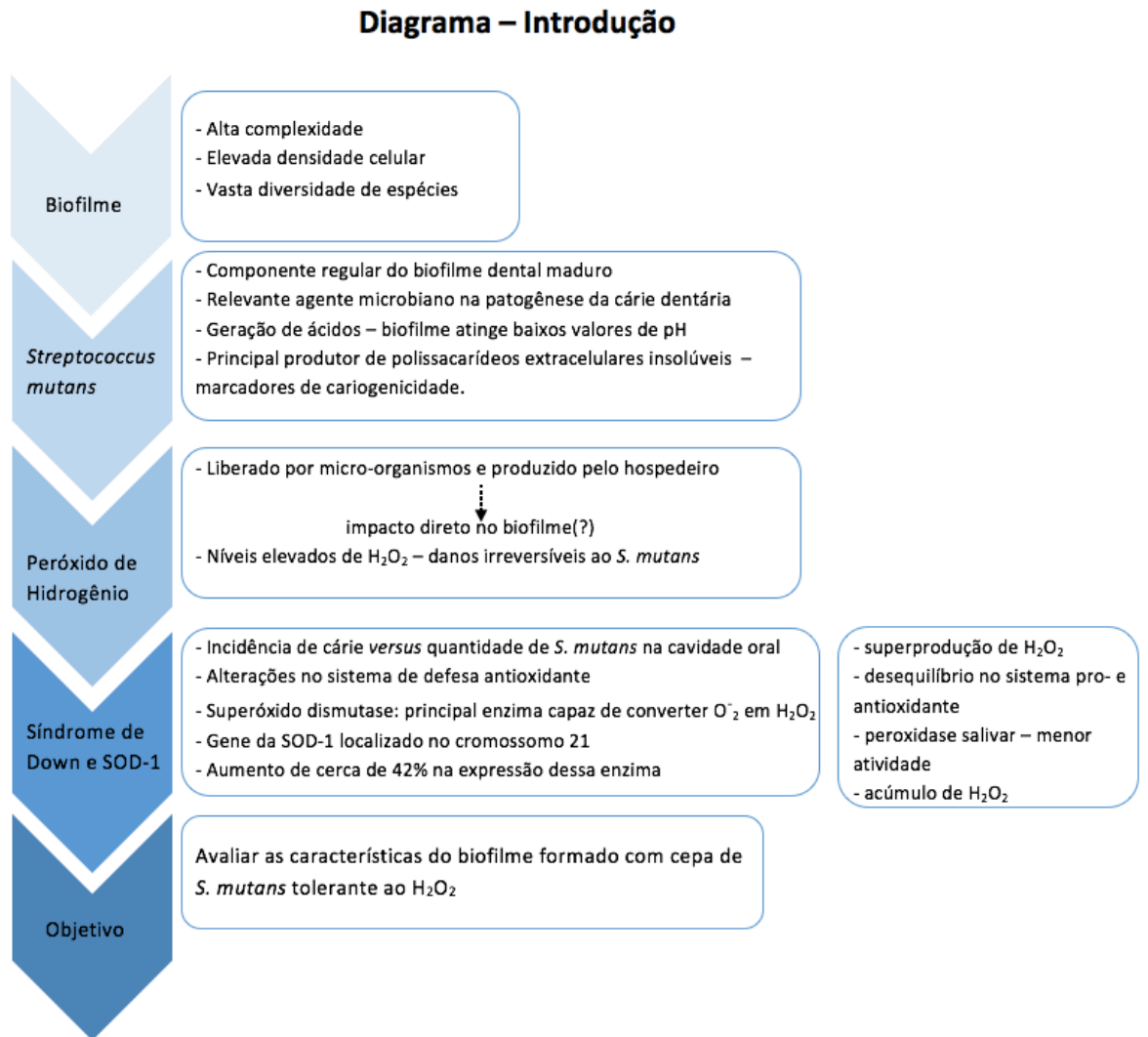
O H_2O_2 é liberado por alguns micro-organismos incluindo estreptococos bucais¹³, e também é produzido pelo hospedeiro¹⁴. Porém, até o momento, não se tem conhecimento se essa produção pelo hospedeiro tem um impacto direto no biofilme, uma vez que o H_2O_2 é transitório na cavidade bucal, devido a efetiva ação das peroxidases salivares¹⁵. Além disso, o H_2O_2 produzido endogenamente também é degradado pela hidroperóxido reductase e pelas catalases¹⁶ produzidas por alguns micro-organismos, mas não por *S. mutans*¹³. No entanto, essas enzimas podem ser inativadas na presença de níveis elevados de H_2O_2 , e não oferecem uma proteção eficaz dos componentes celulares contra este composto¹⁶.

A literatura tem relatado acúmulo do H_2O_2 no organismo de indivíduos com Síndrome de Down (SD)¹⁷⁻²⁰. Paralelamente, tem sido demonstrada uma relação entre a baixa incidência de cárie e a reduzida quantidade de *S. mutans* na cavidade bucal desses indivíduos^{21,22}. Entretanto, Cogulu et al.²³ verificaram que apesar da menor incidência de cárie, não existia diferença estatística na quantidade de *S. mutans* entre indivíduos com SD e não sindrômicos, e levantaram a hipótese de que a menor prevalência de cárie pode estar relacionada à colonização por *S. mutans* com perfil genotípico menos cariogênico nesses indivíduos.

Alterações no sistema de defesa antioxidante são observadas nos indivíduos com SD^{18,19,24}, e estas podem ser explicadas pelo fato de a superóxido dismutase (SOD), principal enzima capaz de converter o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ter o gene da sua principal isoenzima, a SOD-1, localizado no cromossomo 21²⁵. Como 95% dos indivíduos com SD apresentam a trissomia simples desse cromossomo, o que determina um aumento de cerca de 42% na expressão da SOD-1²⁶, a qual tem sua atividade também aumentada, causando um desequilíbrio no sistema pro- e antioxidante, por meio da superprodução de H_2O_2 ^{18,19}. Além disso, segundo Siqueira e Nicolau²⁷, a peroxidase salivar que é uma das enzimas responsáveis por neutralizar o H_2O_2 , apresenta menor atividade no grupo com SD. Esses fatores contribuem para que ocorra um acúmulo do H_2O_2 nesses indivíduos. Considerando que a menor incidência de cárie possa estar relacionada com alterações induzidas pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na espécie cariogênica *S. mutans*, torna-se importante avaliar as características do biofilme formado com cepa de *S. mutans* tolerante ao H_2O_2 .

A figura 1 mostra o diagrama da sequência da introdução.

Figura 1 – Diagrama resumindo a sequência de ideias apresentadas na introdução



Fonte: Elaboração própria.

2 PROPOSIÇÃO

Gerar uma cepa de *Streptococcus mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio, e avaliar, in vitro, a formação de biofilmes com essa cepa, bem como fatores relacionados com a sua virulência.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Na tentativa de facilitar a leitura, este capítulo foi dividido em três tópicos: (1) Síndrome de Down / Estresse oxidativo / Prevalência de Cárie Dental; (2) Biofilme Dental - papel de *Streptococcus mutans* no desenvolvimento da cárie; e (3) Peróxido de Hidrogênio - importante fonte endógena de estresse oxidativo para bactérias bucais.

3.1 Síndrome de Down / Estresse Oxidativo / Prevalencia de Cárie Dental

A síndrome de Down (SD) é uma patologia causada pela trissomia do cromossomo 21. Além da deficiência mental e anormalidades anatômicas, o envelhecimento prematuro é característico desta doença. Kedziora & Bartosz²⁴ realizaram uma revisão de literatura analisando principalmente os dados sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os mecanismos de defesa antioxidante nos indivíduos com SD, bem como, a sensibilidade das células desses indivíduos às diferentes fontes de ROS. Concluíram que as alterações na defesa antioxidante se devem principalmente a localização do gene da superóxido dismutase (SOD-1) no cromossomo 21, e sugeriram que o aumento da atividade da SOD-1 resulta num aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, num distúrbio do equilíbrio de ROS, que pode ser considerado um ponto-chave na patogênese da síndrome.

A prevalência de carie dentária e de doença periodontal, bem como a relação entre prevalência de cárie, pH salivar e níveis salivares de *Streptococcus mutans* em crianças com SD foram estudadas por Stabholz et al.²¹. Trinta e duas crianças com síndrome de Down, com idades entre 8 e 13 anos, foram comparadas com dois grupos controle de faixas etárias similares (crianças saudáveis e crianças com deficiência mental) que viviam na mesma instituição. O grupo de crianças com SD mostrou uma experiência de cárie significativamente menor em comparação com os grupos controle. A contagem de *Streptococcus mutans* (em UFC) foi menor no grupo com SD, embora não estatisticamente significativa em comparação com a contagem nas crianças saudáveis. Ambos os grupos apresentaram número de *S. mutans* na saliva significativamente inferior ao grupo de crianças com deficiência mental. Para os níveis de pH salivar foram registradas diferenças significativas dos grupos de crianças com

SD e com deficiência mental em relação ao grupo de crianças saudáveis. No geral, 84% das crianças com SD não apresentaram a doença cárie.

De acordo com De La Torre et al.²⁶, a SD resulta da trissomia do cromossomo 21 em todas as células dos pacientes afetados e é o mais freqüente dos defeitos congênitos. Esta doença é caracterizada por anomalias do desenvolvimento, retardo mental e características de envelhecimento precoce, particularmente no cérebro. A superóxido dismutase de cobre/zinco (CuZnSOD) é uma das proteínas codificadas pelo cromossomo 21 (seguimento 21q22.1). Como consequência do excesso de expressão do gene, a atividade da CuZnSOD é aumentada. Neste trabalho foi avaliada a atividade da SOD em pacientes com SD com trissomia completa do cromossomo 21, trissomia parcial do cromossomo 21, translocações e mosaïcismo, a fim de confirmar o efeito da dosagem de SOD nas características clínicas do indivíduo com SD e ajudar a estabelecer qual a região crítica do cromossomo 21. A CuZnSOD foi medida em glóbulos vermelhos. Na população com trissomia completa do cromossomo 21, a atividade da SOD foi aumentada em 42%; na população com trissomia parcial, translocações e mosaïcismo, a atividade da SOD foi normal. Na população diagnosticada com SD, mas não cariotipada, a atividade da SOD mostrou-se aumentada em 28%. Os autores concluíram que o segmento 21q22.1 não é a região crítica responsável pela SD, já que encontraram a atividade normal de SOD em pacientes com características clínicas da SD.

Jovanovic et al.¹⁷ realizaram análises de amostras de urina de 85 indivíduos com SD, os quais foram pareados com seus irmãos não sindrômicos com idade próxima. Os níveis de 8-hidroxi-20-desoxiguanosina, um biomarcador de danos oxidativos ao DNA, e do malondialdeído, um biomarcador de peroxidação lipídica, mostraram-se significativamente elevados nos indivíduos com SD em comparação com os irmãos não sindrômicos. Esses resultados forneceram evidências diretas de aumento do estresse oxidativo em indivíduos com DS.

Uma cópia extra do cromossomo 21 causa a síndrome de Down, que afeta até 1 em 700 nascidos vivos. Hattori et al.²⁵ mostraram a sequência e o catálogo de genes do braço longo do cromossomo 21. Foram sequenciados 33.546.361 pares de bases (pb) de DNA com uma precisão muito alta. Assim, 99,7% de cobertura do braço longo do cromossomo 21 (21q) foi alcançada. Também foram sequenciados 281.116 pb no braço curto. As características estruturais identificadas incluem duplicações que provavelmente estão envolvidas em anormalidades cromossômicas e estruturas

repetidas nas regiões teloméricas e pericentroméricas. A análise do cromossomo revelou 127 genes conhecidos, 98 genes preditos e 59 pseudogenes. Seus achados confirmaram que o gene da superóxido dismutase (SOD-1), principal enzima capaz de converter o radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , está localizado no cromossomo 21.

Siqueira e Nicolau²⁷ avaliaram alguns fatores na saliva estimulada de crianças com SD, incluindo pH, fluxo salivar, ácido siálico, concentração de proteínas, e atividade da α -amilase e da peroxidase. As amostras de saliva foram coletadas de 35 crianças com idade entre 6 e 10 anos, 17 com SD e 18 não sindrômicas. Para estimular a produção de saliva, as crianças mastigaram um parafilme por 10 minutos antes da coleta. Logo após a coleta da saliva, foi medido o fluxo salivar e o pH. Posteriormente, foram determinados os níveis de ácido siálico pelo método do ácido thiobarbiturico, e a concentração de proteínas usando o reagente fenol de Folin. A amilase foi avaliada pela quantificação da maltose produzida pela degradação do amido, e a peroxidase usando a orto-dianisidina. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de ácido siálico (livre e total) entre os dois grupos. A concentração de proteína foi cerca de 36% maior no grupo com SD. No entanto, as taxas de fluxo salivar, pH, atividade da amilase e da peroxidase foram menores entre as crianças com SD.

O processo acelerado de envelhecimento que ocorre nos indivíduos com SD pode estar associado ao estresse oxidativo. Como a enzima superóxido dismutase é aumentada em cerca de 50% nas crianças com SD, a glutathione e outros mecanismos antioxidantes foram estudados por Pinto et al.¹⁸ para determinar se existia alterações em espécies reativas de oxigênio. As enzimas glutathione, fosfatase ácida, metahemoglobina redutase e transmembrana redutase foram avaliadas no plasma e nos glóbulos vermelhos do sangue de crianças portuguesas com síndrome de Down e seus irmãos, que foram usados como grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de estudo e controle. Foi observada uma correlação negativa entre a glutathione total e a fosfatase ácida nas crianças sem SD, mas não naquelas com SD. Os autores concluíram que embora se afirme que a produção de peróxido de hidrogênio é aumentada em crianças com SD, os mecanismos antioxidantes não pareceram ser significativamente diferentes quando essas crianças foram comparadas com seus irmãos não sindrômicos. Isso pode resultar em um excesso de espécies reativas de oxigênio que pode ajudar a explicar o envelhecimento acelerado em indivíduos com SD.

Garcez et al.¹⁹ avaliando 50 indivíduos com SD e 50 sem SD (controle), pareados por idade e gênero, verificaram que os níveis séricos de substâncias reativas, ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ao ácido úrico e as atividades da superóxido dismutase e da catalase séricas mostraram-se aumentados no grupo de indivíduos com SD. Também houve um ligeiro aumento na fragilidade osmótica de eritrócitos nesses indivíduos comparados com os não sindrômicos. Segundo os autores, este estudo foi pioneiro em mostrar a atividade sérica da superóxido dismutase e da catalase aumentadas em indivíduos com SD, contribuindo para um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelo estresse oxidativo aumentado nesses indivíduos. Esses resultados podem ser úteis para o desenvolvimento de futuras terapias antioxidantes com o objetivo de melhorar a qualidade de vida de indivíduos com SD.

Cogulu et al.²⁸ realizaram um estudo com o objetivo de comparar a prevalência de cárie, de IgA secretora salivar (slgA), pH salivar, capacidade tampão e fluxo salivar, entre indivíduos com SD e indivíduos controle. Setenta e três crianças institucionalizadas com SD e 70 crianças normais de 7 a 12 anos de idade foram incluídas neste estudo. Foram registrados hábitos de escovação dentária e exposição diária ao açúcar na dieta das crianças, renda familiar e níveis de escolaridade dos pais. Não houve diferenças significativas nos hábitos de escovação dentária e na exposição diária ao açúcar na dieta das crianças, renda familiar e níveis educacionais dos pais entre os dois grupos. Os níveis de slgA salivares foram significativamente maiores no grupo com SD. O pH, e capacidade tampão da saliva foram semelhantes nos grupos com SD e controle. Uma menor prevalência de cárie e níveis mais elevados de slgA salivar foram encontrados em crianças com SD e houve correlação negativa significativa entre cárie dentária e slgA salivar. Esse achado tende a sustentar a hipótese de que níveis mais altos de slgA salivar podem proteger contra a doença cárie.

Ainda em 2006, Cogulu et al.²³ compararam a prevalência de cárie entre crianças com SD e sem SD, e investigaram a diferença entre os genótipos de *S. mutans* em ambos os grupos. Sessenta crianças com SD e 64 sem SD entre 7 e 12 anos foram incluídas neste estudo. Todos os dentes irrompidos foram avaliados de acordo com os critérios recomendados pela Organização Mundial da Saúde. Amostras de saliva não estimulada foram obtidas e usadas para o cultivo de *S. mutans* em meio *Tryptone-yeast-cystine*. A tipagem molecular de cepas de *S. mutans* foi realizada

utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (AP-PCR) arbitrariamente preparada com primer OPA-05. O índice de cárie foi significativamente menor nas crianças com SD, e os níveis salivares de *S. mutans* não mostraram diferença significativa entre crianças com SD e sem SD. De acordo a tipagem realizada por AP-PCR, os perfis de *S. mutans* que colonizaram o grupo com SD foram diferentes do grupo controle. A relação entre esses diferentes perfis genotípicos e a prevalência de cárie dentária foi estatisticamente significante, o que permitiu concluir que os perfis genotípicos de *S. mutans* colonizados no grupo com SD podem ser um motivo da baixa prevalência de cárie.

Com o objetivo de melhor entender os mecanismos que determinam as diferenças entre crianças com SD e crianças saudáveis com relação a incidência de cárie dental, Davidovich et al.²⁸ investigaram o estado de saúde bucal, o pH da mucosa e a concentração de íons na saliva nessas populações. O grupo de estudo compreendeu 70 crianças com SD e 32 crianças saudáveis. Os índices de cárie foram significativamente menores no grupo de crianças com SD. O pH e a concentração de íons na saliva foram significativamente diferentes entre as crianças com SD e as saudáveis. O pH da mucosa foi significativamente menor em crianças com SD com cárie do que em crianças SD sem cárie e crianças saudáveis com e sem cárie. Os níveis de cloreto e cálcio foram significativamente maiores no grupo SD em comparação com o grupo controle com e sem cárie. Os níveis de sódio e potássio foram significativamente maiores no grupo SD com cárie comparado ao grupo SD sem cárie. Os índices de placa e gengival foram significativamente maiores em crianças com SD com cárie em comparação com crianças SD livres de cárie. As variáveis estudadas não foram capazes de explicar a menor incidência de cárie em crianças com SD. Entretanto, os autores acreditam que a trissomia do cromossomo 21 pode se manifestar nas glândulas salivares determinando uma concentração diferenciada de eletrólitos na saliva, que pode levar a uma menor incidência de carie nesses indivíduos.

Embora a incidência de doenças bucais seja considerável em indivíduos com SD, a prevalência de cárie dentária neste grupo é baixa. Areias et al.²² conduziram um estudo que teve como objetivo comparar fatores de risco para o desenvolvimento de cárie dentária em crianças com SD e uma população controle constituída por irmãos dessas crianças. A saliva estimulada por parafilme foi coletada e o índice de cárie foi avaliado em 45 pares de irmãos entre 6 e 18 anos de idade. Na saliva foram avaliados

o número de micro-organismos acidogênicos, como estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e espécies de *Candida*, o pH, o fluxo salivar e a concentração de IgA. As crianças com SD apresentaram índice de cárie e contagem de *S. mutans* significativamente menores em comparação com seus irmãos. Foram encontrados números semelhantes de lactobacilos e espécies de *Candida* em ambos os grupos. As taxas de fluxo salivar foram 36% menores nas crianças com SD e o pH salivar não diferiu entre crianças com SD e controle. As crianças com SD tiveram uma taxa de secreção de IgA 29% inferior à de seus irmãos, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Concluiu-se que, apesar do fluxo salivar reduzido, o menor número de *S. mutans* na saliva pode ser um dos fatores que contribuem para a menor incidência de cárie nos indivíduos com SD.

Komatsu et al.²⁹ tiveram como objetivo avaliar a 8-hidroxi-20-desoxiguanosina (8-OHdG), um biomarcador de estresse oxidativo, na saliva de indivíduos com SD. Participaram do estudo 66 indivíduos SD e 71 indivíduos sistemicamente sadios (controle), com condições periodontais semelhantes. Os níveis salivares de 8-OHdG foram determinados em ensaio de imuno-absorbância e mostraram-se significativamente maiores nos indivíduos com SD do que nos controles. Assim, os autores sugeriram que o estresse oxidativo pode contribuir para as características clínicas da SD, particularmente a periodontite progressiva associada com o envelhecimento precoce. Além disso, o nível salivar de 8-OHdG pode ser um biomarcador útil para avaliação do estresse oxidativo em indivíduos com SD.

Com o objetivo de investigar sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e os níveis de biomarcadores de dano oxidativo na saliva, Sousa et al.³⁰ 2014 coletaram amostras de saliva de 30 pacientes adolescentes e adultos jovens com SD e controle. As análises realizadas demonstraram que pacientes com SD apresentaram concentrações significativamente maiores de superóxido dismutase, níveis mais elevados de malondialdeído e teor de proteína total salivar do que os controles. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada entre pacientes com SD e controles, nas concentrações de proteínas carboniladas ou antioxidantes (ácido úrico, vitamina C, peroxidase e capacidade antioxidante total da saliva). Baseados no aumento significativo das concentrações de malondialdeído e superóxido dismutase encontrados na saliva de indivíduos com SD, os pesquisadores concluíram que eles são mais vulneráveis ao estresse oxidativo.

Segundo Muchová et al.²⁰, o estresse oxidativo é um fenômeno associado ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, e as defesas antioxidantes. Em indivíduos com SD, o estresse oxidativo é associado à trissomia do cromossomo 21 que resulta em aumento da atividade de um importante antioxidante, a enzima superóxido dismutase (SOD), cujo gene está localizado no cromossomo 21 juntamente com outras proteínas. Na defesa contra os efeitos tóxicos dos radicais livres e seus metabólitos, o organismo conta com sistemas de defesa antioxidante. A sua falha ou função reduzida aumentam o estresse oxidativo, resultando em ruptura da estrutura de biomoléculas importantes, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Isso leva a disfunções que afetam a fisiopatologia dos órgãos e de todo o organismo. Neste artigo foi mostrado o impacto positivo da suplementação controlada com antioxidantes, bem como da prática regular de exercícios físicos sobre as deficiências cognitivas e de aprendizagem em indivíduos com SD.

Domingues et al.³¹ investigaram alguns parâmetros salivares entre crianças com SD e sem SD. Saliva total estimulada foi coletada de 18 crianças com SD e 23 sem SD. Foram determinadas a taxa de fluxo salivar, pH e capacidade tampão da saliva, e quantificados os micro-organismos cariogênicos e periodontopatogênicos, o perfil antioxidante e a concentração de malondialdeído (MDA). A taxa de fluxo salivar foi significativamente menor nos indivíduos com SD do que nos controles. As dosagens de proteína total, atividade da superóxido dismutase (SOD), e MDA foram significativamente mais altas no grupo com SD. Concluíram que o fluxo salivar reduzido pode ser um fator importante para o desenvolvimento das doenças bucais, e, níveis salivares de SOD e MDA elevados indicam uma influência significativa do estresse oxidativo no desenvolvimento precoce da doença periodontal em indivíduos com SD.

3.2 Biofilme Dental: Papel de *Streptococcus mutans* no Desenvolvimento da Cárie

Segundo Marquis³², a cariogenicidade do biofilme está relacionada aos níveis populacionais de organismos tolerantes a ácidos, como *S. mutans*. No entanto, as características do biofilme permitem a sobrevivência de uma microbiota diversificada, incluindo micro-organismos menos tolerantes a ácidos. O biofilme geralmente é considerado relativamente anaeróbio. No entanto, existem evidências de que tanto o

biofilme supragengival como o subgengival possuem metabolismo ativo do oxigênio, e que as bactérias, incluindo anaeróbios, desenvolveram defesas contra o estresse oxidativo. A descoberta de que as bactérias do biofilme produzem uma variedade de enzimas protetoras é um bom indicador de que o estresse oxidativo faz parte da vida cotidiana. O caráter de biofilme dental permite a diversidade populacional e a coexistência de micro-organismos aeróbios, anaeróbios e microaerófilos. Em geral, os agentes que afetam o metabolismo oxidativo oferecem possibilidades para reduzir a atividade patogênica do biofilme.

Em 2000, Rosan e Lamont⁷ consideraram o biofilme dental complexo, e, embora seja composto por mais de 500 espécies bacterianas, a colonização segue um padrão regular, com adesão de colonizadores iniciais à película salivar adquirida, seguido da colonização secundária pela adesão interbacteriana. Uma variedade de adesinas e interações moleculares contribuem para o desenvolvimento do biofilme e de doenças bucais, como a cárie e a doença periodontal.

Segundo Ajdić et al.³³, *Streptococcus mutans* é considerado o mais cariogênico de todos os estreptococos bucais. O genoma de *S. mutans* UA159, foi sequenciado e forneceu informações sobre a sua adaptação para sobreviver no ambiente bucal, que inclui a aquisição de recursos, defesa contra fatores do hospedeiro e uso de produtos genéticos que mantêm seu nicho contra outros micro-organismos. Além disso, todas as vias não oxidativas que o *S. mutans* utiliza para metabolizar uma grande variedade de carboidratos foram identificadas juntamente com os sistemas de transporte, cujos genes representam quase 15% do seu genoma. Os genes da virulência associados com a produção de glucano extracelular aderente, adesinas, tolerância ácida, proteases e hemolisinas também foram identificados. Os autores concluíram que a cepa UA159 contém todos os genes essenciais para a competência, os quais regulam a densidade populacional por meio de sinalização química.

Os primeiros micro-organismos a colonizarem a superfície do dente, *Streptococcus* e *Actinomyces*, com frequência coagregam entre si e com outras bactérias orais, influenciando o desenvolvimento do biofilme. Para avaliar o papel das interações interbacterianas na formação de biofilmes in vivo, Palmer et al.², usaram anticorpos contra componentes de superfície bacteriana que as interações de coagregação como sondas de imunofluorescência em conjunto com microscópio confocal a laser, para determinar a distribuição e o arranjo espacial das bactérias no

interior do biofilme formado em fragmentos de esmalte. Na coagregação intragenérica, estreptococos como *Streptococcus gordonii* reconhecem os polissacarídeos receptores (RPS) de outros estreptococos como *Streptococcus oralis*. Para definir subconjuntos potencialmente interativos de estreptococos no biofilme em desenvolvimento, um anticorpo contra RPS (anti-RPS) foi utilizado em conjunto com um anticorpo contra *S. gordonii* DL1 (anti-DL1). Esses anticorpos reagiram principalmente com células únicas em biofilmes de 4 h e com microcolônias de espécies mistas em biofilmes de 8 h. Na coagregação intergenética entre estreptococos e actinomices, as fimbrias do tipo 2 de actinomices reconhecem RPS nos estreptococos. Os resultados deste estudo demonstraram pela primeira vez, a coagregação mediada por interações durante o acúmulo inicial do biofilme in vivo, bem como, o desenvolvimento espaço-temporal e a prevalência de comunidades de espécies diferentes no biofilme inicial.

Em revisão de literatura, Jenkinson e Lamont⁴ afirmaram que apesar da cavidade bucal abrigar uma comunidade abundante e diversificada de micro-organismos, até recentemente, as associações entre o hospedeiro e as bactérias bucais eram consideradas uma multiplicidade de interações de espécies únicas. No entanto, estudos moleculares mostraram que os micro-organismos bucais compõem uma comunidade complexa e que a saúde bucal ou a doença dependem da relação entre o hospedeiro e a comunidade microbiana. Assim, a compreensão das comunidades microbianas é o ponto chave para combater as doenças bucais.

O equilíbrio ecológico entre as diferentes espécies pode ser rompido por fatores ambientais ou biológicos, levando a doenças. Kreth et al.⁹, utilizaram duas espécies bacterianas bucais, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*, para investigar os possíveis mecanismos de competição/coexistência entre diferentes espécies que ocupam o mesmo nicho ecológico. Mostraram que as duas espécies apresentam múltiplas interações antagônicas que dependem do tempo e espaço. A ocupação de um nicho por uma espécie exclui a colonização pela outra, enquanto a colonização simultânea por ambas as espécies resulta em coexistência. Algumas condições ambientais, como a densidade celular, disponibilidade nutricional e pH, desempenham papel importante na determinação do resultado dessas interações. As análises genéticas e bioquímicas revelaram que essas interações entre espécies podem ser mediadas pela produção bem regulada de produtos químicos, como bacteriocinas

(produzidas por *S. mutans*) e peróxido de hidrogênio (produzido por *S. sanguinis*). De acordo com as características fenotípicas, a produção de bacteriocinas e H₂O₂ são reguladas por condições ambientais, bem como pela justaposição das duas espécies. Essas interações inter-espécies podem desempenhar um papel essencial no equilíbrio competição/coexistência dentro das comunidades microbianas multiespecies.

Para persistir na cavidade bucal, as bactérias têm que ter a capacidade de tolerar diversas flutuações ambientais, particularmente alterações no pH e na disponibilidade de nutrientes. *Streptococcus* cariogênicos dependem do biofilme para sobreviverem na cavidade bucal e tem desenvolvido mecanismos sofisticados para lidar com o estresse ambiental. Para determinar os principais fatores que permitem que essas bactérias se sobressaiam como membros significativos de biofilmes dentários durante condições adversas, Lemos et al.³⁴ realizaram uma revisão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes, tolerância ao estresse e metabolismo do açúcar em estreptococos patogênicos, em especial *Streptococcus mutans*. Os autores ressaltaram que o estresse oxidativo parece ser minimizado nos biofilmes de estreptococos devido ao reduzido metabolismo do oxigênio por esta bactéria, com reduzida produção de ROS. Portanto, esta pode ser uma estratégia importante para a sobrevivência do micro-organismo, com uma baixa taxa de crescimento num ambiente competitivo e superpopuloso como o biofilme

A colonização microbiana inicial da superfície dentária é um processo seletivo, com predominância de algumas espécies bacterianas. A caracterização da microbiota inicial é o primeiro passo para o entendimento das interações entre os membros da comunidade que modulam o desenvolvimento do biofilme. Usando métodos moleculares e um modelo de fragmentos de esmalte recuperáveis, Diaz et al.³ caracterizaram a diversidade microbiana no biofilme dental inicial de três indivíduos. Foram analisadas um total de 531 sequencias do gene 16S rRNA, e identificados 97 filotipos distintos. A composição da comunidade microbiana foi estatisticamente diferente entre os indivíduos, entretanto, em todos os indivíduos, nos biofilmes de 4 e 8 horas houve predominância de *Streptococcus* spp. (principalmente *S. oralis* e *S. mitis*). Esse estudo mostrou que a comunidade microbiana no biofilme inicial de cada indivíduo é única em termos de diversidade e composição, e sugeriu que as interações espaço temporais e alterações ecológicas que ocorrem com a maturação do biofilme também são indivíduo dependente.

Marsh³⁵ descreveu o biofilme dental como uma comunidade estrutural e funcionalmente organizada, com uma composição microbiana diversa que, na saúde, permanece relativamente estável ao longo do tempo (homeostase microbiana). O desenvolvimento da doença pode ser vista como uma quebra dos mecanismos homeostáticos entre a microbiota e o hospedeiro. As espécies predominantes nos sítios doentes são diferentes das encontradas em sítios saudáveis, embora os micro-organismos patogênicos possam ser freqüentemente detectados em índices baixos em sítios saudáveis. Na cárie dentária, há uma mudança na predominância da comunidade por espécies acidogênicas e ácido-tolerantes, como *S. mutans* e *Lactobacillus*, embora outras espécies possam estar envolvidas. As estratégias para controlar a cárie dentária podem incluir a inibição do desenvolvimento do biofilme (por exemplo, prevenção da adesão de bactérias cariogênicas, manipulação de mecanismos sinalização celular, uso de antimicrobianos efetivos, etc.) ou melhora das defesas do hospedeiro. Além disso, estas abordagens mais convencionais podem ser ampliadas pela interferência com os fatores que permitem as bactérias cariogênicas escapar dos mecanismos homeostáticos normais que restringem seu crescimento no biofilme e competir com os micro-organismos associados à saúde. Evidências sugerem que condições regulares de baixo pH no biofilme são seletivos para *S. mutans* e *Lactobacillus*. Assim sendo, a supressão do catabolismo de açúcares e da produção de ácidos pelo uso de inibidores metabólicos e de carboidratos não fermentáveis, ou a estimulação do fluxo salivar, podem ajudar na manutenção da homeostase no biofilme.

Em outra revisão, Lemos e Burne³⁶ comentam que o genoma simplificado do *S. mutans* revela um organismo bem adaptado à sua existência em biofilmes multiespécies nas superfícies dentárias. No entanto, esse micro-organismo é carente em muitos dos sistemas sensores e outros fatores alternativos que as bactérias costumam usar para coordenar a expressão gênica em resposta ao estresse e às alterações no meio ambiente. Ressaltam que nos últimos anos, a genômica funcional e a proteômica tem contribuído para a compreensão de como *S. mutans* integra o fator regulador de estresse e os reguladores transcricionais de expressão gênica para coordenar as respostas às flutuações ambientais com a modulação da virulência, de uma forma a garantir a sua permanência na cavidade bucal e criar condições favoráveis para o desenvolvimento da cárie dentária.

Ge et al.³⁷ avaliaram a colonização por *S. mutans* e *S. sanguinis* na cavidade bucal e a sua associação com a cárie precoce severa da infância (S-ECC). Para isso, amostras de saliva e biofilme foram coletadas de 14 crianças com S-ECC e 8 crianças livres de cárie. Todas as crianças com S-ECC foram *S. mutans* positivas, 100% das crianças livres de cárie e 93% das crianças com S-ECC foram *S. sanguinis* positivas. A severidade da cárie mostrou correlação positiva significativa com os níveis de *S. mutans*, estreptococos totais, micro-organismos totais cultiváveis, e com a idade da criança. A interação de *S. sanguinis* com *S. mutans* foi um fator significativo associado com a condição de cárie em crianças, sugerindo que os níveis desses dois micro-organismos na cavidade bucal têm um papel importante no desenvolvimento da cárie.

No biofilme, diversas espécies bacterianas competem por espaço e nutrientes e, em condições de saúde é mantido um equilíbrio ecológico. Este equilíbrio pode ser perturbado por fatores ambientais e interações inter-espécies permitindo o crescimento dominante de espécies que levam ao desenvolvimento de doenças. Para avaliar o antagonismo interespecies de forma clinicamente relevante, Kreth et al.⁵ estudaram três espécies orais bem caracterizadas e estreitamente relacionadas, *S. gordonii*, *S. sanguinis* e *S. mutans*. As espécies *S. sanguinis* e *S. gordonii* usaram a disponibilidade de oxigênio e a produção diferencial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para competir efetivamente contra *S. mutans*. O antagonismo entre espécies foi influenciado pela repressão da produção de H₂O₂ mediada pela glicose. Além disso, as condições aeróbias estimularam o sistema de competências e a expressão da bacteriocina mutacina IV por *S. mutans*, bem como, a liberação de H₂O₂ nas culturas mistas de *S. sanguinis* e *S. gordonii*. Esses dados fornecem informações importantes sobre os fatores ecológicos que determinam a competição entre os estreptococos orais, colonizadores bucais pioneiros e os mecanismos de sobrevivência de *S. mutans* no biofilme.

Exterkate et al.³⁸, em 2010, avaliaram os efeitos de um agente preventivo de cárie (fluoreto de amina) sobre *S. mutans* e sobre biofilmes polimicrobianos. Os autores desenvolveram um modelo de aderência ativa que consistia em uma tampa contendo discos de vidro que se encaixava em placas de 24 poços. Esse modelo permitia que os discos ficassem posicionados verticalmente, favorecendo a formação de biofilme somente com células capazes de aderir aos espécimes, evitando a deposição e aderência dos micro-organismos pela força da gravidade. Os biofilmes de *S. mutans* e polimicrobianos com até 96 horas de formação, foram tratados com

soluções de fluoreto de amina. A viabilidade dos biofilmes foi determinada pela contagem de UFC, e a atividade metabólica foi medida pela produção de lactato. O efeito da solução de fluoreto de amina sobre a viabilidade dos biofilmes polimicrobianos foi significativamente menor do que sobre os biofilmes de *S. mutans*, indicando uma maior resistência dos biofilmes complexos. Ambos os tipos de biofilme tornaram-se mais resistentes à solução de fluoreto de amina com a idade. A maior resistência dos biofilmes polimicrobianos não se refletiu na atividade metabólica; em experimentos avaliando dose-resposta, a solução de fluoreto de amina reduziu a produção de lactato de forma semelhante em ambos os tipos de biofilme. Este estudo mostrou que para avaliar a eficácia de agentes preventivos da cárie, é essencial usar modelos apropriados de biofilme polimicrobiano e, analisar a sua capacidade de promover a redução da formação de ácido, bem como a redução da viabilidade bacteriana.

Segundo Jakubovics e Kolenbrander⁸, a colonização de superfícies bucais por micro-organismos ocorre em uma seqüência característica de estágios. Inicia com a adesão de bactérias em receptores de células epiteliais ou na película salivar que se forma sobre as superfícies dentárias. As interações interbacterianas facilitam a ligação de novas espécies e aumentam a diversidade da população microbiana aderente. O crescimento microbiano é influenciado pela troca de sinais químicos, metabólitos e produtos tóxicos entre as células, e a produção de polímeros extracelulares forma uma matriz protetora para as bactérias. Finalmente, a produção de ácidos e a ativação da resposta imune contribuem para o desenvolvimento da cárie dentária e da doença periodontal, respetivamente. Assim, a compreensão em nível molecular dos principais fatores microbianos envolvidos em cada etapa na formação de biofilmes bucais possibilita novas oportunidades para o desenvolvimento de medidas preventivas ou terapêuticas destinadas a controlar as doenças infecciosas bucais.

É amplamente aceito que as características fenotípicas das bactérias cultivadas em biofilmes são substancialmente diferentes das cultivadas em suspensão. Como os biofilmes são o *habitat* natural para a grande maioria das bactérias bucais, incluindo aquelas que contribuem para doenças bucais, Lemos et al.³⁹ afirmaram ser necessário uma melhor compreensão da fisiologia das populações aderentes para controlar os micro-organismos bucais na saúde e na doença.

Segundo Dewhirst et al.¹ a microbiota bucal tem sido caracterizada por métodos de cultivo e moleculares e compreende mais de 600 espécies com diferentes subtipos predominando nos diferentes *habitats* (entre eles dentes, gengiva, sulco gengival, língua, palato e mucosa jugal). Um dos objetivos desse estudo foi validar e expandir as espécies incluídas no HOMD (*Human Oral Microbiome Database*) e melhor entender a diversidade e distribuição dos micro-organismos no microbioma bucal. A sequência do gene 16S rRNA de 36.043 clones isolados de estudos da microbiota bucal, foi avaliada para determinar a taxa de abundância relativa e identificar a taxa de novos candidatos. A análise identificou uma taxa de 1.179 filotipos, dos quais 24% foram nomeados, 8% foram cultivados mas não nomeados e 68% não foram cultivados. Depois da validação, uma taxa de 434 novos filotipos serão adicionados ao HOMD que é a primeira descrição do microbioma associado ao ser humano e fornece ferramentas que permitem entender o papel do microbioma na saúde e na doença.

O acúmulo de micro-organismos nas superfícies dentárias e o estabelecimento de biofilmes patogênicos são favorecidos por exopolissacarídeos, principalmente glucanos, sintetizados por glucosiltransferases estreptocócicas (Gtfs). Koo et al.⁴⁰ avaliaram o papel das Gtfs de *S. mutans* na formação da matriz de polissacarídeos extracelulares e a sua influência na formação de microcolônias e no estabelecimento de *S. mutans* em biofilmes de multi-espécies in vitro. A capacidade de cepas de *S. mutans* defeituosas nos genes *gtfB* (associado à síntese de glucano insolúvel) e *gtfC* (associado a síntese de glucano insolúvel e solúvel) para formar microcolônias in vitro foi significativamente afetada. No entanto, é necessária a deleção de ambos os genes para interromper a formação de matriz de polissacarídeos extracelulares e a formação do biofilme. Quando *S. mutans* foi cultivado em meio com sacarose, na presença de *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii*, houve formação constante de exopolissacarídeos, que permitiram o agrupamento inicial de células bacterianas e o desenvolvimento de microcolônias extremamente organizadas, tendo *S. mutans* se tornado a principal espécie no biofilme maduro. Quando a sacarose foi substituída por glicose, não houve formação da matriz de polissacarídeos extracelulares nem das microcolônias. Esses dados mostram que GtfB e GtfC são essenciais para a formação da matriz de polissacarídeos extracelulares, mas GtfB parece ser responsável pela formação de microcolônias por *S. mutans*. Portanto, esses processos mediados por

Gtfs podem melhorar a competitividade de *S. mutans* em biofilmes multi-espécies formados nas superfícies dentárias.

Apesar de *S. mutans* ser um dos principais agentes etiológicos da cárie dental, o conhecimento disponível sobre a variabilidade do conteúdo genético dessa espécie e sua relação para adaptação ao meio, é muito restrito. Cornejo et al.⁴¹ estudaram a sequência genômica de 57 isolados de *S. mutans*, bem como de cepas representativas de espécies relacionadas, para identificar a estrutura global e as características adaptativas dos componentes do genoma e visando entender o impacto da seleção genética. O conteúdo genético divergente máximo entre as cepas foi de aproximadamente 23%. O genoma do núcleo consistiu em 1.490 genes, e sugeriu que 73 genes presentes em todos os isolados de *S. mutans* mas ausente em outras espécies do grupo mutans. Alguns desses genes estão associados com metabolismo de carboidratos, resistência a ambientes ácidos, regulação do estresse oxidativo, e adesão aos tecidos do hospedeiro, e contribuir para a adaptação de *S. mutans* ao ambiente bucal, bem como as alterações de dieta.

De acordo com Klein et al.⁴², biofilmes são comunidades microbianas bem organizadas envolvidas em uma matriz extracelular. *Streptococcus mutans* é um importante produtor de substâncias poliméricas extracelulares, incluindo exopolissacarídeos (EPS), DNA extracelular (eDNA) e ácido lipoteicoico (LTA). A matriz rica em EPS proporciona estabilidade mecânica e facilita a criação de microambientes extremamente ácidos, que são críticos para a patogênese da cárie dentária. eDNA e LTA contribuem com o desenvolvimento da matriz e a formação de biofilmes altamente coesivos. eDNA e outras substâncias extracelulares em conjunto com EPS, podem afetar as propriedades funcionais da matriz e a virulência de biofilmes cariogênicos. Os autores acreditam que a melhor compreensão sobre a formação da matriz extracelular pode levar a abordagens eficazes de controle das doenças relacionadas ao biofilme.

Para Takahashi e Nyvad¹⁰, de acordo com a hipótese ecológica, o processo de cárie consiste de 3 estágios. A microbiota nas superfícies de esmalte clinicamente saudáveis é composta principalmente por estreptococos não-mutans e *Actinomyces*, e a acidez do meio é leve e infrequente, o que é compatível com o equilíbrio entre desmineralização e remineralização (estágio de estabilidade dinâmica). O consumo frequente de açúcares leva a uma acidificação moderada e frequente do meio, aumentando a acidogenicidade e a aciduricidade adaptativa de bactérias não-mutans,

bem como o número de cepas não-mutans acidúricas. Estes processos de adaptação e seleção microbiana induzidos pelo gradiente ácido podem, ao longo do tempo, romper o equilíbrio desmineralização/remineralização (Des/Re) levando a perda de minerais e ao início/progressão da cárie dentária (estágio acidogênico). Sob condições ácidas severas e prolongadas, as bactérias acidúricas se tornam dominantes (estágio acidúrico). Nesta fase, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, bem como cepas acidúricas de estreptococos não mutans, *Actinomyces*, bifidobactérias, e leveduras podem se tornar dominantes. Sugeriram, então que a acidificação ambiental é a principal determinante das mudanças fenotípicas e genotípicas que ocorrem na microbiota durante o desenvolvimento da cárie dentária.

A diversidade e a estrutura da microbiota do biofilme supragengival na saúde e na presença de cárie dentária não são bem compreendidas. Xiao et al.⁶ extraíram o DNA genômico bacteriano de 160 amostras de biofilmes supragingivais de indivíduos sem cárie e de cárie dentária com diferentes graus de severidade. A análise mostrou que a diversidade microbiana em biofilmes de indivíduos com saúde bucal excedeu aquela da cárie dentária, com a diversidade diminuindo gradualmente de acordo com a gravidade da cárie. A estrutura da comunidade microbiana do biofilme foi semelhante em todos os grupos. Com isso sugeriam que estratégias de tratamento direcionadas para a modulação das interações microbianas e sua produção funcional sejam desenvolvidas.

Bowen et al.¹¹ definem biofilmes como uma estrutura altamente organizada formada por comunidades microbianas envolvidas por uma matriz extracelular, que tem a capacidade de causar muitas infecções em humanos. A cárie dentária é uma doença causada por biofilmes polimicrobianos dependente da dieta e das interações microbiota-matriz. Açúcares propiciam o surgimento de agentes patogênicos, a formação da matriz e a acidificação do microambiente do biofilme, promovendo mudanças ecológicas que acabam resultando na desmineralização dos tecidos mineralizados do dente. Neste trabalho, foram discutidos os avanços recentes sobre o papel da matriz do biofilme e das interações entre patógenos oportunistas e comensais na patogênese da cárie dentária. Além disso, foi destacada a importância dos micro-organismos produtores de matriz na promoção de um *habitat* patogênico em que a competição e as sinergias entre espécies produzem o processo da doença.

3.3 Peróxido de Hidrogênio: Importante Fonte Endógena de Estresse Oxidativo para Bactérias Orais

Segundo Carlsson¹⁴, todas as células vivas convertem oxigênio em espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. O sistema de defesa do organismo tem a função de impedir a formação dessas espécies reativas de oxigênio, inativar aquelas já formadas e reparar os danos por elas causados. Na cavidade bucal, a defesa contra o H₂O₂ produzido pelas bactérias que colonizam as membranas mucosas e pelas células das glândulas salivares é feita pela enzima peroxidase salivar que detoxica o H₂O₂ na presença do tiocianato, convertendo-o em hipotiocianato, oxigênio e água. O hipotiocianato tem a propriedade de interromper a produção de H₂O₂ pelas bactérias bucais. A capacidade do sistema de peroxidase salivar para interromper a glicólise bacteriana já é conhecida e sugeriu-se que a subsequente inibição da produção de ácido pelas bactérias pode influenciar no potencial de cárie dentária da microbiota bucal.

O H₂O₂ é produzido por vários membros do gênero *Streptococcus*, entre eles *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*. Barnard e Stinson¹² avaliaram a influência de diferentes condições ambientais na síntese de H₂O₂ por *S. gordonii*. As maiores taxas de H₂O₂ foram sintetizadas na presença de 0,1 mM de sacarose e 1 mM de glicose. *S. gordonii* parece apresentar um estoque intracelular de polissacarídeos que possibilita a formação de H₂O₂ mesmo na ausência de carboidratos. A presença de íons pesados inibiu a peroxidogênese e condições anaeróbias induziram a redução adaptativa da síntese de H₂O₂. Entretanto, a síntese de H₂O₂ não foi alterada pelo aumento na concentração de sais, alteração no conteúdo mineral da solução e por alterações de pH entre 5,0 e 7,5. Houve um estímulo da síntese na presença de 1 mM de magnésio e de 10 a 50 mM de L-lactato de potássio. Essas respostas do micro-organismo podem ter um papel importante na ecologia do biofilme e, conseqüentemente, na saúde bucal.

As catalases são enzimas protetoras responsáveis pela degradação do peróxido de hidrogênio antes que ele possa danificar os componentes celulares. Estão presentes em praticamente todos os organismos aeróbios e muitos organismos anaeróbios. As catalases de 16 organismos diferentes, foram purificadas e caracterizadas por Switala e Loewen¹⁶. Os autores mostraram que na presença de concentrações elevadas de H₂O₂, houve a inativação da enzima e isso que pode levar a uma proteção ineficaz dos componentes celulares contra este composto.

O sistema de resposta do hospedeiro é composto por vários mecanismos que controlam a reação à infecção microbiana da cavidade bucal. A característica heterogênea da cavidade bucal e os diversos microambientes produzidos, originam diferentes substâncias químicas que afetam o sistema imune inato. Ashby¹⁵ realizou uma revisão de literatura avaliando como essas diferenças espaciais influenciam as duas maiores peroxidases defensivas da cavidade bucal, peroxidase salivar (SPO) e mieloperoxidase (MPO). Na presença do H₂O₂, as peroxidases defensivas usam íons inorgânicos para produzir antimicrobianos que, geralmente, são mais eficazes do que o próprio H₂O₂. Um segundo objetivo desta revisão foi avaliar o quanto a variação entre pessoas pode contribuir para a função da peroxidase. Muitas dessas diferenças foram atribuídas a práticas dietéticas que alteram as concentrações de espécies inorgânicas relevantes na cavidade bucal. Devido à complexidade da biologia do hospedeiro, da microbiota e da química associada, é difícil estabelecer o significado dos sistemas de peroxidase humana durante a patogênese das doenças bucais.

O H₂O₂ é considerado uma importante fonte endógena de estresse oxidativo para bactérias orais e também é amplamente utilizado em produtos de cuidados bucais. Baldeck e Marquis¹³ tiveram como objetivo identificar alvos específicos para danos induzidos pelo H₂O₂ em células de *S. mutans* e diferenciar ações bacteriostáticas e bactericidas do H₂O₂. *S. mutans* foi cultivado em suspensão e em biofilmes monoespécie, para avaliar o dano causado pelo H₂O₂ na viabilidade celular, glicólise e síntese de proteínas. O H₂O₂ em baixas concentrações (16,3 mM) foi altamente inibitório para a glicólise e principalmente bacteriostático. Já em concentrações maiores (acima de 30 mM), o H₂O₂ tornou-se principalmente bactericida, mas não foi mutagênico para *S. mutans*. Verificaram ainda, que no biofilme as células possuem essencialmente a mesma sensibilidade ao H₂O₂ que as células em suspensão.

Numa revisão da literatura, Zhu e Kreth⁴³ relataram que durante o metabolismo aeróbio, os estreptococos orais são capazes de produzir quantidades de H₂O₂ suficientes para inibir crescimento do biofilme. Mostraram ainda, que H₂O₂ não é um simples subproduto do metabolismo, ele interfere em vários aspectos da ecologia do biofilme bacteriano bucal. A liberação de DNA das células está intimamente associada à produção de H₂O₂ por *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus gordonii*. O eDNA é crucial para o desenvolvimento e estabilização do biofilme, e também é usado como fonte para a transferência horizontal de genes entre os estreptococos orais.

Adicionalmente, devido à natureza inibidora de crescimento apresentada pelo H_2O_2 , as espécies compatíveis com H_2O_2 associam-se aos produtores. A produção de H_2O_2 pode, portanto, ajudar na estruturação do desenvolvimento inicial do biofilme. Por outro lado, o ambiente bucal contém peroxidases salivares que são potentes na eliminação do H_2O_2 . Portanto, os efeitos da produção intrínseca de H_2O_2 no biofilme podem ser estritamente locais. No entanto, tendo em conta que 80% dos componentes iniciais do biofilme bucal são estreptococos, a influência do H_2O_2 no desenvolvimento do biofilme e na adaptação ambiental parece ser relevante.

A natureza tóxica aguda do H_2O_2 levanta a interessante questão de como estreptococos lidam com o H_2O_2 produzido intrinsecamente, e que subsequentemente se acumula no microambiente e ameaça a população microbiana local. Xu et al.⁴⁴ investigaram a susceptibilidade ao H_2O_2 de *S. gordonii* e *S. sanguinis* e elucidaram os potenciais mecanismos de como eles se protegem do efeito deletério do H_2O_2 . Ambos os organismos são considerados colonizadores primários e ocupam o mesmo nicho intraoral que os torna alvos potenciais para o H_2O_2 produzido por outras espécies. Demonstraram que *S. gordonii* produziu relativamente mais H_2O_2 e teve maior capacidade de resistência ao estresse causado por este composto. A maior resistência de *S. gordonii* ao H_2O_2 em relação a *S. sanguinis*, é provavelmente devida a presença mecanismos internos de proteção ao estresse oxidativo mesmo em condições anaeróbias. A capacidade de produzir mais H_2O_2 e ser mais resistente ao H_2O_2 pode favorecer *S. gordonii* no ambiente competitivo do biofilme bucal.

Giacaman et al.⁴⁵ conduziram um estudo com o objetivo de fazer uma estimativa da colonização bucal por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* em adultos com alta experiência de cárie e sem nenhuma experiência de cárie. Compararam também a quantidade de H_2O_2 produzida ex-vivo por *S. sanguinis* isolado de ambos os grupos. Amostras de saliva foram coletadas e semeadas em placas de ágar para quantificação de estreptococos totais, *S. mutans* e *S. sanguinis*. Colônias de *S. sanguinis* dos dois grupos foram inoculadas em Prussian blue agar para detecção de H_2O_2 . A contagem de *S. sanguinis* foi significativamente superior em indivíduos livres de cárie, enquanto a de *S. mutans* foi significativamente mais alta em indivíduos com alta experiência de cárie. As colônias de *S. sanguinis* de indivíduos livres de cárie produziram halos significativamente maiores de H_2O_2 comparadas com aquelas de indivíduos com alta experiência de cárie. Os achados sugerem fortemente

que *S. mutans* pode ser predominante em relação à *S. sanguinis* na saliva de adultos com alta experiência de cárie.

S. mutans tem grande influência no desenvolvimento de biofilmes patogênicos associados à cárie dentária. Liu et al.⁴⁶, usando um modelo de biofilme ecológico, avaliaram o impacto do co-cultivo de vários isolados de *S. mutans* com *S. oralis* e *A. naeslundii* na composição do biofilme após exposição à sacarose. A cepa de referência *S. mutans* UA159 e os isolados clínicos Smu44 (mais acidúricos), Smu56 (formação de biofilme alterada) e Smu81 (mais sensível ao estresse oxidativo) foram utilizados no estudo. Os dados revelaram que os isolados de *S. mutans* variaram em sua capacidade de competir e se tornaram dominantes no biofilme após a adição de sacarose, e essa diferença teve correlação com a sensibilidade ao H₂O₂ produzido por *S. oralis*. Smu81 foi particularmente sensível ao H₂O₂ e não foi capaz de competir com *S. oralis* no biofilme de espécies mistas, apesar de formar biofilmes robustos quando isolado. Portanto, a diminuição da tolerância ao estresse oxidativo em isolados de *S. mutans* pode prejudicar sua capacidade de competir em biofilmes complexos, mesmo na presença de sacarose, o que pode influenciar a progressão de uma comunidade de biofilme saudável para uma capaz de causar doença.

O regulador de estresse oxidativo Spx é encontrado em bactérias Gram-positivas, inclusive em *S. mutans*, sendo SpxA1 o principal ativador de genes de estresse oxidativo e SpxA2 desempenha um papel secundário. Kajfasz et al.⁴⁷ usaram o sequenciamento de RNA para definir competência do regulador de estresse peroxidativo e a significância da regulação de Spx em *S. mutans*. Os dados do transcriptoma confirmaram a relação entre Spx e os genes tipicamente associados ao estresse oxidativo, e identificaram novos genes e vias metabólicas controlados pela Spx durante o estresse peroxidativo. Verificaram que a inativação de genes únicos de estresse peroxidativo não teve nenhuma consequência para a sobrevivência bacteriana, mas a criação de mutantes duplos revelou que com excessão do gene $\Delta alsS\Delta spxA1$ os outros quatro genes inativados ($\Delta adhD\Delta spxA1$, $\Delta hisC\Delta spxA1$, $\Delta plA\Delta spxA1$ and $\Delta gdhA\Delta spxA1$) eram necessários para a sobrevivência ao estresse. Adicionalmente, ensaios fisiológicos e bioquímicos mostraram que SpxA1 coordena as alterações transcricionais durante o estresse de peróxido que modificam o metabolismo global e estimulam a produção de antioxidantes.

4 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia deste estudo foi desenvolvida em duas principais etapas. A primeira visando a obtenção de uma cepa de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a segunda para avaliar a influência do H_2O_2 na formação do biofilme e na expressão de fatores de virulência de *S. mutans*.

4.1 Obtenção de Cepa de *S. mutans* Tolerante ao H_2O_2

Para avaliar a tolerância ao H_2O_2 foi empregada metodologia semelhante à usada por Xu et al.⁴⁴. A cepa de *S. mutans* UA159 armazenada em freezer -80°C , foi reativada em placas com ágar BHI, as quais foram incubadas por 48 horas, a 37°C e com 5% de CO_2 . Posteriormente, as placas foram armazenadas em geladeira a 4°C , e usadas no período máximo de um mês.

Antes de iniciar os desafios para obter a cepa tolerante ao H_2O_2 , foi realizado um estudo piloto para definir a concentração de H_2O_2 e o tempo de contato deste com o micro-organismo, adequados para reduzir ao máximo o número de micro-organismos sem eliminá-los.

O pré-inóculo foi preparado pela transferência de 2 a 5 colônias individuais da cepa para tubos falcon contendo 2 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion- HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) com adição de 0,8% de glicose. Os tubos foram incubados durante 18 horas (5% de CO_2 e 37°C). As culturas foram diluídas 1:20 no mesmo meio de cultura fresco, e incubadas sob as mesmas condições, até atingirem densidade óptica correspondente ao meio da fase exponencial de crescimento ($OD_{540\text{nm}} = 0,52 \pm 0,048$).

Em seguida, as células foram separadas por centrifugação (4500 rpm, 15 minutos, 4°C) (Centrífuga 5804R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), lavadas duas vezes com tampão PBS (NaCl 8g; KH_2PO_4 0,24g; KCL 0,2g; Na_2HPO_4 1,44g por litro), e ressuspensas em 1 ml de tampão glicina (13 mg por mL de água milliQ)³⁹. O H_2O_2 a 30% (Sigma Aldrich, Gillingham, Reino Unido) foi diluído com tampão glicina imediatamente antes do experimento, até a obtenção de diluições contendo o dobro das concentrações desejadas de H_2O_2 . Alíquotas de 200 μL da suspensão bacteriana foram distribuídas em tubos de eppendorf de 1,5 mL aos quais foram acrescentados

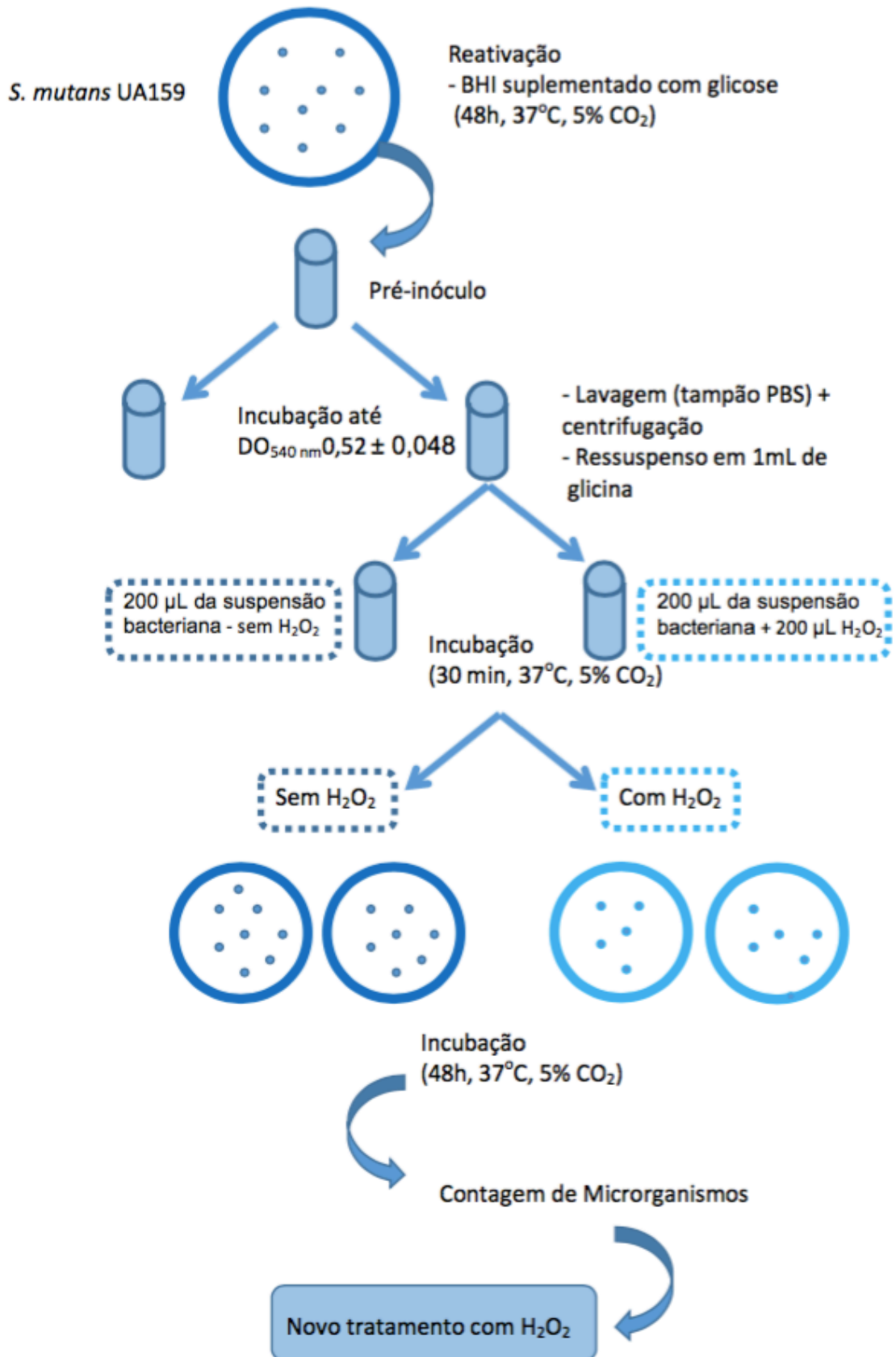
200 μL do H_2O_2 preparado.

Inicialmente, foram realizados três estudos piloto nos quais as concentrações finais de H_2O_2 e o tempo de incubação foram: Piloto1: concentrações 0,4; 1,4; 4; 10 mM ^{43,44} tempo 30 min; Piloto 2: concentrações 40 e 80 mM , tempo 30 min; Piloto 3: concentrações 80 e 160 mM tempo 60 min. Os tubos permaneceram em estufa com 5% de CO_2 a 37°C pelo tempo previamente estabelecido. Uma alíquota da suspensão bacteriana não tratada com H_2O_2 foi usada como controle. Após incubação as células foram lavadas 2 vezes com PBS para remover o H_2O_2 residual, diluídas seriadamente e semeadas em ágar BHI (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia). Após 48 horas de incubação (37°C e 5% de CO_2) foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) com o auxílio de um contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix Indústria de Equipamentos Científicos, Araraquara, SP, Brasil).

Esses procedimentos foram realizados em duplicata, e, após a realização do terceiro piloto, definiu-se usar a concentração de 80 mM e o tempo de exposição de 60 minutos para a continuação dos desafios para obtenção da cepa tolerante. Assim, 2 a 5 colônias de micro-organismos que sobreviveram a este desafio, foram transferidas para tubos falcon contendo caldo BHI com adição de 1% de glicose, incubados por 18 horas (5% de CO_2 e 37°C), foi feita a diluição 1:20, nova incubação até atingirem a $\text{OD}_{540\text{nm}}=0,52 \pm 0,048$ e foram novamente tratados com a concentração de 80 mM de H_2O_2 , e assim sucessivamente até a obtenção da cepa de *S. mutans* tolerante. A placa com a cepa considerada tolerante foi mantida em geladeira e usada para os experimentos deste estudo no período máximo de 1 mês.

A figura 2 mostra o fluxograma para obtenção da cepa de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio.

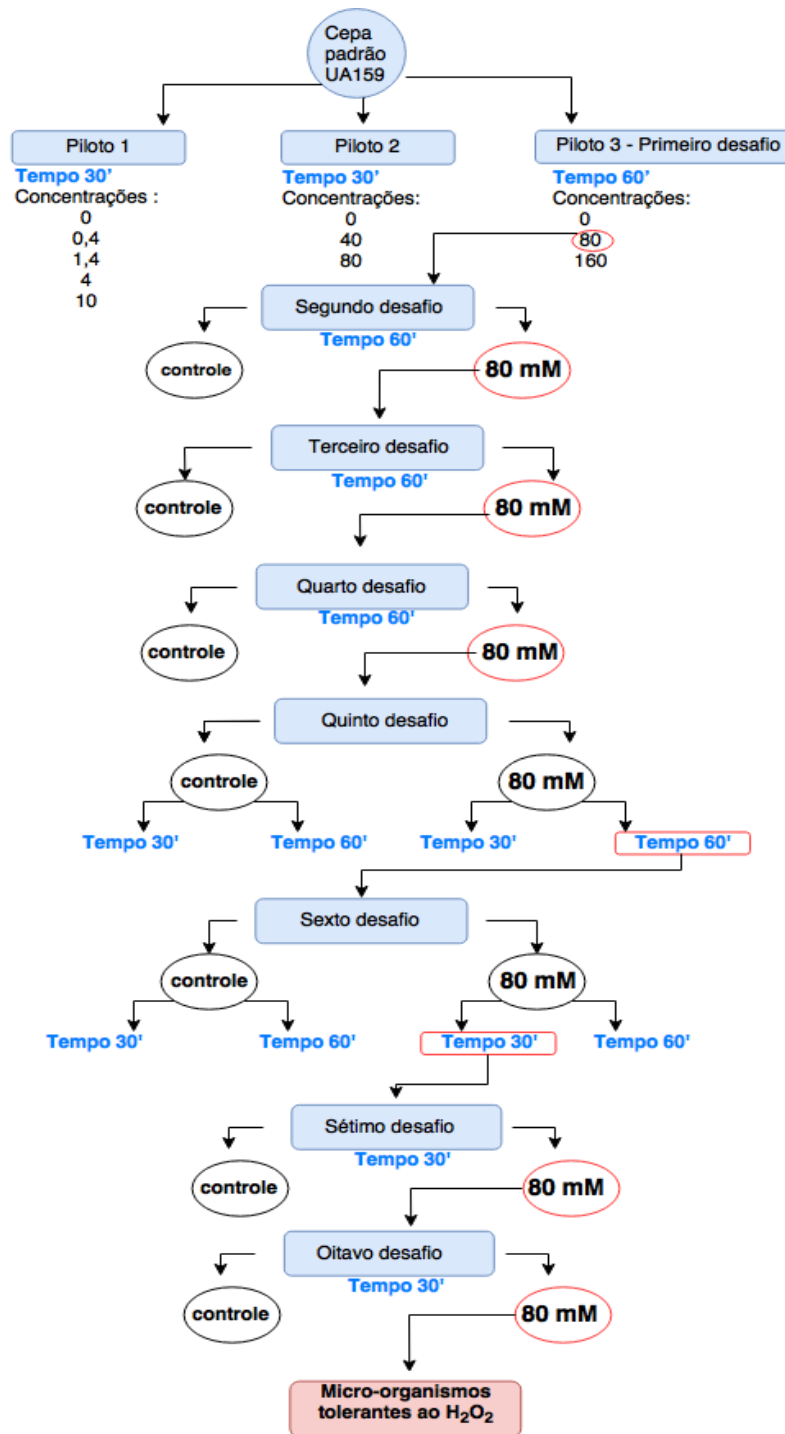
Figura 2 – Fluxograma para obtenção da cepa de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio



Fonte: Elaboração própria.

A figura 3 mostra a representação gráfica da sequência de execução desta fase dos experimentos.

Figura 3 – Representação gráfica da obtenção de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂)



Fonte: Elaboração própria.

4.2 Crescimento dos Biofilmes de *Streptococcus mutans*

O estudo compreendeu os seguintes grupos: GC (controle) - cepa de *S. mutans* UA159, GTsPH - cepa de *S. mutans* UA159 tolerante ao H₂O₂ obtida após o 8º desafio (Figura 3) sem acrescentar H₂O₂ ao meio de cultura, e GTcPH - cepa de *S. mutans* UA159 tolerante ao H₂O₂ com acréscimo de H₂O₂ no meio de cultura.

Para o crescimento dos biofilmes (n=12 por grupo) foi usado o modelo de aderência ativa de Exterkate et al.³⁸, com algumas modificações no dispositivo onde foram fixadas as lamínulas de vidro jateadas. Esse modelo permite que as lamínulas sejam posicionadas verticalmente e favorece a formação de biofilme somente com células capazes de aderir aos espécimes, evitando a deposição e aderência dos micro-organismos pela força da gravidade.

Lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro (Knittel glass, SPLab Comércio de Produtos Laboratoriais, São Paulo - Brasil) jateadas com óxido de alumínio 90 microns por 15 segundos de cada lado, foram colocadas em recipiente de vidro contendo água miliQ e lavadas em ultrason por 10 min, 3 vezes. Em seguida, foram secas em temperatura ambiente por 1 hora, fixadas verticalmente em um dispositivo confeccionado em fio ortodôntico e esterilizadas em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Para a formação da película salivar, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Anexo; CAAE: 64746217.5.0000.5416) e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, a saliva estimulada pela mastigação de parafilme foi coletada no período da manhã, em quatro indivíduos adultos jovens saudáveis. Estes tiveram que obedecer os seguintes critérios de inclusão: estar em jejum, não ter feito uso de antibiótico nos últimos 3 meses, não ter usado nenhum tipo de enxaguatório bucal no dia, ter escovado os dentes com dentifrício contendo apenas flúor. Esta foi misturada com tampão de adsorção (Tampão AB – 0,05 M KCl; 0,02 M KPO₄; 0,02 M CaCl₂; 0,02 M MgCl₂) numa proporção de 1:1(v/v), seguida pela adição de 0,1 M PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma Aldrich, Gillingham, Reino Unido) numa relação de 1:1000 (concentração final de 0,1 mM PMSF). O conteúdo foi centrifugado por 15 minutos a 4500 rpm, 4 °C (Centrífuga 5504R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), e o

sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro com membrana de polietersulfona (PES) de 0,22 μm , e permaneceu no gelo até a sua utilização.

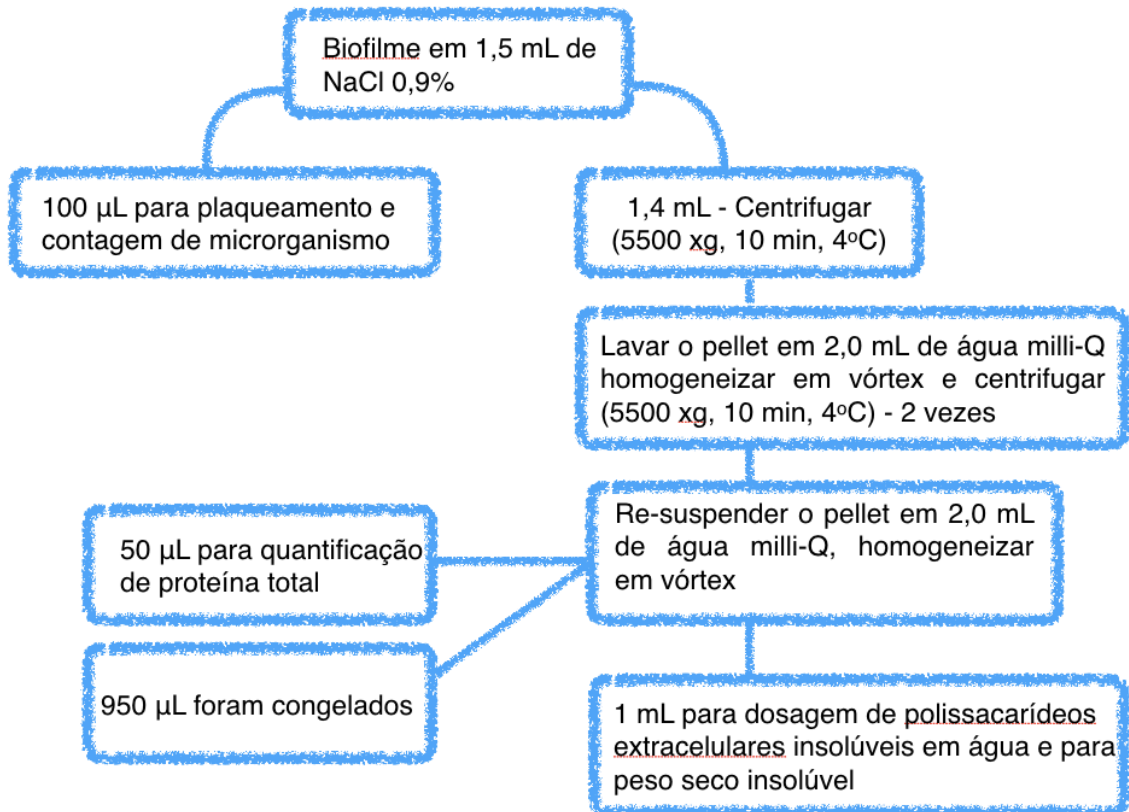
Em seguida, foram colocados 2,8 mL da saliva clarificada e filtrada em cada poço da placa de 24 poços (Modelo 92024, TPP - Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) e o dispositivo com as lamínulas de vidro esterilizadas foi posicionado na placa com o auxílio de uma pinça. O conjunto foi incubado a 37°C, sob agitação (75 rpm) por 1 hora para formação da película salivar. As lamínulas foram enxaguadas em Tampão AB e transferidas para placas de 24 poços (Modelo 92024, TPP - Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça), contendo 2,8 mL de meio de cultura BHI suplementado com 1% de sacarose inoculado com 10^6 UFC de *S. mutans*/mL (cepa padrão ou cepa tolerante ao peróxido de hidrogênio). No grupo GTcPH, o H_2O_2 foi acrescentado no meio de cultura fresco na concentração de 80 mM (conforme determinado no item 4.1), em cada troca de meio. As placas foram incubadas a 37°C em condições de microaerofilia (5% CO_2) por 5 dias (120 horas). A cada 24 horas o meio foi substituído por meio fresco, e no final do quinto dia foi quantificado o pH do meio usando pHmetro (Modelo Q400RS- QUIMIS, Diadema São Paulo, Brasil).

4.3 Processamento dos Biofilmes

Decorridas 116,5 horas de crescimento dos biofilmes, as lamínulas foram removidas dos poços contendo o meio de cultura, lavadas por 10 segundos em NaCl 0,9% estéril para remoção de células não aderidas. Em seguida, foram novamente imersas em meio de cultura fresco (BHI suplementado com 0,8% de sacarose) e as placas foram incubadas por 3,5 horas. Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi coletado para análise da concentração de ácido láctico e as lamínulas foram lavadas em NaCl 0,9% estéril (duas vezes), removidas do dispositivo e transferidas individualmente para tubos de vidro contendo 1 mL de NaCl 0,9%. Esses tubos foram colocados em um béquer contendo água estéril e submetidos a banho ultrassônico por 10 minutos, por duas vezes, para remoção dos biofilmes das lamínulas. Posteriormente, as lamínulas foram raspadas com espátula de aço inoxidável esterilizada para remover o biofilme residual. A suspensão bacteriana foi transferida para tubos tipo Falcon de 15 mL. Cada tubo de vidro foi lavado com 0,5 mL de NaCl 0,9%, que foi adicionado ao tubo Falcon correspondente, resultando num volume final de 1,5 mL de suspensão do biofilme em NaCl 0,9%. Essa suspensão foi

homogeneizada com sonda ultrassônica com uma potência de 7 W (Sonicador Q125, Qsonica) por 30 segundos e foi usada para as análises de acordo com o fluxograma (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma para processamento dos biofilmes para a contagem de micro-organismos e análises bioquímicas



Fonte: Elaboração própria.

4.3.1 Contagem de micro-organismos do biofilme

Uma alíquota de 100 µL da suspensão de biofilme foi transferida para tubo contendo 900 µL de NaCl 0,9%, foi feita a diluição seriada e foram semeadas as diluições até 10^{-6} , em BHI ágar, em duplicata. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 48 horas. Em seguida, as colônias foram contadas com o auxílio de um contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix Indústria de Equipamentos Científicos, Araraquara, SP, Brasil) e utilizadas para o cálculo de UFC por mililitro.

4.3.2. Análise da concentração de ácido láctico

A concentração de ácido láctico foi determinada no meio de cultura utilizando o método enzimático⁴⁸. Para isso, em uma placa de microtitulação de 96 poços, foram colocados 85 μ L de glicina (75 g/L), 85 μ L de sulfato de hidrazina (10^4 g/L), 20 μ L de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (18 g/L), e, acrescentados 10 μ L do meio de cultura no qual os biofilmes ficaram imersos. A absorbância foi aferida a 340 nm (A1). Em seguida, foi adicionado 10 μ L de desidrogenase L-láctica (1 g/L) em cada poço e, após manter por 1 h a temperatura ambiente, a absorbância foi novamente aferida a 340 nm (A2). A quantidade de ácido láctico (Δ L) foi obtida através da fórmula (Δ L= A2-A1) e os valores foram convertidos para μ mol/mL de ácido láctico, tendo como base as leituras da curva de calibração feita com padrões de ácido L-láctico de 0,2 a 3 μ mol/mL.

4.3.3 Análise bioquímica

Os 1,4 mL restantes da suspensão de biofilme de cada lamínula foram centrifugados (5.500 xg, 10 minutos, 4 °C). O pellet foi lavado duas vezes com água milli-Q, homogeneizado em vortex e centrifugado (5.500 xg, 10 minutos, 4 °C) e, posteriormente foi novamente ressuspensionado em 2,0 mL de água milli-Q, homogeneizado em vortex e separado em alíquotas para a determinação do peso seco insolúvel e das análises de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água e proteína total.

4.3.3.1 Determinação do peso seco insolúvel e dosagem de polissacarídeos extracelulares (EPS) insolúveis em água

Um mL da suspensão de biofilme foi centrifugado (10.000 xg, 5 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco por 2 horas e meia em um concentrador de amostras (Modelo RVC 2-18C D, Maruin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) e pesado em balança de alta precisão, para se obter o peso seco do biofilme. Em seguida, foi adicionado 300 μ L de NaOH 1N por mg de peso seco em cada tubo. O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado em vortex por 1 min e incubado a 37°C por 10 min em incubadora orbital. Em seguida, as

amostras foram novamente homogeneizadas no vortex por 1 min e incubadas por 30 min em incubadora orbital, e agitadas no vortex por 1 min. Em seguida, permaneceram na incubadora até completar 2 horas e foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 min a 4°C (Centrífuga 5804R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Esse procedimento se repetiu 2 vezes. Na terceira vez, após ressuspender o precipitado (300 µL de NaOH 1 N por mg de peso seco do precipitado), o conteúdo foi homogeneizado em vortex por 1 min e centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C (Centrífuga 5804R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), o sobrenadante foi coletado e colocado no mesmo tubo Falcon.

No tubo de 15 mL com o sobrenadante, foi adicionado etanol 95% em volume correspondente a 3 vezes o volume do NaOH usado, homogeneizado em vortex e colocado em freezer -20°C por no mínimo 18 horas para precipitação dos polissacarídeos extracelulares insolúveis em água.

Em seguida, as amostras foram novamente agitadas no vortex e centrifugadas a 9.500 rpm por 20 min a 4°C (Centrífuga 5804R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado 3 vezes com etanol 75%. O precipitado foi ressuspensão com 7 mL de etanol, agitado em vortex, centrifugado (9.500 rpm por 20 min a 4°C) e o sobrenadante foi novamente descartado. As amostras foram deixadas nos tubos abertos, em bancada, por aproximadamente 1 hora para a completa evaporação do etanol.

Em seguida o precipitado foi ressuspensão com NaOH 1 N (300 µL por peso seco) e congelado a -80°C até a realização do ensaio colorimétrico.

Os polissacarídeos foram quantificados usando o método fenol-ácido sulfúrico⁴⁹. Primeiramente, foi preparado o fenol 5% na capela de exaustão.

Curvas padrão de glicose foram realizadas em duplicata, utilizando água milli-Q, glicose a 0,01% (0, 0,75, 1,25, 2,5, 5,0, 10, 15, 20 e 25 µg) e NaOH 1 N em tubos de ensaio de vidro. A somatória dos volumes foi sempre 200 µL. Em cada tubo, foi adicionado 200 µL de fenol, homogeneizado, e adicionado 1000 µL de ácido sulfúrico (95-97%). A leitura da densidade ótica foi feita 20 min após a adição de ácido sulfúrico no primeiro tubo (tempo necessário para a finalização da reação bioquímica), com o auxílio de um espectrofotômetro (DO 490 nm). Os padrões foram usados em duplicata

e quando os dados da curva apresentarem inclinação: 0,048- 0,051 e R^2 próximo de 1, foi iniciado o processamento das amostras.

As análises dos biofilmes foram realizadas em triplicata, usando tubos de vidro contendo 200 μL da amostra, e o fenol e o ácido sulfúrico foram adicionados da mesma forma usada para obtenção da curva padrão. Os valores de DO 490 nm foram anotados e convertidos em concentração de polissacarídeos insolúveis em água, utilizando a equação da reta gerada na curva padrão realizada.

4.3.3.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o kit BCA (Bicinchoninic Acid, Sigma, EUA). Inicialmente, 50 μL da suspensão do biofilme foram incubados em banho seco a 100°C por 1 hora a 1000 rpm. Em seguida, foi preparada uma solução usando 1000 μL do reagente “A” e 20 μL do reagente “B” do kit, e 200 μL dessa solução foram colocados em poços de uma placa de 96 poços, aos quais foram acrescentados 25 μL da suspensão do biofilme formado sobre cada lamínula de vidro. A mistura foi homogeneizada por 30 min e a absorbância lida a 562 nm, e comparada a da albumina sérica bovina. Essa quantificação foi feita em duplicata.

4.4 Análise Estatística

Os dados de contagem de micro-organismos do biofilme formado sobre as lamínulas de vidro (em Log_{10} de UFC/mL) e os valores de pH do meio no quinto dia de formação do biofilme mostraram distribuição normal (Shapiro-Wilk; $p \geq 0,090$ e $p \geq 0,139$ respectivamente). Para a concentração de ácido láctico (em $\mu\text{mol/mL}$), houve distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk; $p = 0,742$ e $p = 0,333$ respectivamente para os grupos GC e GTsPH), exceto para o grupo GTcPH (Shapiro-Wilk; $p = 0,034$). Assim, foi considerada uma tendência a normalidade, e optou-se pela aplicação do teste paramétrico de Análise de variância a um fator. Como, para os três conjuntos de dados, o pressuposto de homocedasticidade não foi obedecido (Levene, $p < 0,001$), foi aplicada a correção de Welch, e a comparação dos grupos dois a dois foi feita pelo pós-teste de Games-Howell para dados heterocedásticos.

Para o grupo GTcPH não foi feita a determinação da biomassa (peso seco) do biofilme, devido a pequena quantidade de biofilme formado e ausência de formação de *pellet* após centrifugação. Isso impossibilitou, também, as análises da concentração de proteínas e quantificação de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água para este grupo. Para os grupos GC e GTsPH, houve distribuição normal dos dados de peso seco do biofilme (Shapiro-Wilk; $p=0,052$ e $0,217$ respectivamente), concentração de proteínas (Shapiro-Wilk; $p=0,645$ e $p=0,807$, respectivamente) e concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água (Shapiro-Wilk; $p=0,499$ e $p=0,250$, respectivamente). Também houve homogeneidade de variâncias para todas as análises (Levene; $p=0,104$, $p=0,716$ e $p=0,788$, respectivamente). Assim, para estes três conjuntos de dados foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes.

Todos os testes estatísticos foram efetuados pelo software PASW Statistics (v.22, SPSS Inc, Chicago, IL) considerando-se uma probabilidade de erro tipo I (α) de 0,05.

5 RESULTADO

Os resultados obtidos a partir da análise dos dados estão apresentados em forma de texto e nas Tabelas 1 a 4.

5.1 Obtenção *S. mutans* Tolerantes ao Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A tabela 1 mostra os dados dos pilotos 1, 2 e 3. No piloto 1 observou-se que com a maior concentração de H₂O₂ usada (10 mM), por 30 minutos de exposição, obteve-se uma log redução de apenas 0,56 no número de UFC de *S. mutans*/mL. Isso indicou a necessidade de aumentar a concentração de H₂O₂ para níveis bem mais elevados. Assim, no piloto 2 foram testadas concentrações 4 e 8 vezes maiores (40 mM e 80 mM). Como a redução do número de UFC/mL foi de apenas 3,52 log, com a concentração de 80 mM, decidiu-se manter esta concentração e testar, também a concentração de 160 mM de peróxido de hidrogênio, além de aumentar o tempo de submissão para 60 minutos, no piloto 3. Como a log redução foi bastante próxima para as duas concentrações, decidiu-se utilizar os micro-organismos recuperados que foram submetidos à concentração de 80 mM por 60 minutos, para a realização do próximo desafio, para a obtenção de *S. mutans* tolerante ao H₂O₂.

Tabela 1 – Quantificação de *S. mutans* (Log10 de UFC/mL) e log UFC redução após exposição a diferentes concentrações de H₂O₂ pelos tempos de 30 e 60 minutos (n=2 para cada concentração)

Piloto	Tempo de exposição (min)	Concentração de H ₂ O ₂ (mM)	UFC/mL	Log10 de UFC/mL	Log redução**
1	30	0	2,93E+09	9,47	Controle
		0,4	6,47E+09	9,81	-0,34
		1,4	5,17E+09	9,71	-0,25
		4	4,13E+09	9,62	-0,15
		10	8,00E+08	8,90	0,56
2	30	0	5,20E+09	9,72	Controle
		40	1,43E+07	7,15	2,56
		80	1,55E+06	6,19	3,52
3	60*	0	2,80E+09	9,45	Controle
		80	3,43E+03	3,54	5,91
		160	4,70E+03	3,67	5,78

* em negrito, tempo e concentração definidos para o próximo desafio pela log redução obtida; ressalta-se que este foi considerado como o primeiro desafio e os micro-organismos recuperados foram usados para o próximo desafio.

**controle comparado as demais concentrações.

Fonte: Elaboração própria.

A tabela 2 mostra os resultados dos desafios de 1 a 8, bem como a log redução obtida em cada desafio. No quinto e sexto desafios, optou-se por usar a mesma concentração de H₂O₂ (80 mM), nos tempos de 30 e 60 minutos, a partir do sétimo desafio usou-se apenas o tempo de 30 minutos.

Para cada desafio foram usados os micro-organismos recuperados após o desafio anterior (em negrito na tabela 2).

Tabela 2 – Quantificação de *S. mutans* (UFC/mL) e log UFC redução após exposição a 80 mM de H₂O₂ (n=2 para cada concentração e tempo exposição)

Desafios	Tempo de exposição (min)	Concentração de H ₂ O ₂ (mM)	UFC/mL	LogUFC/mL	Log redução*
1	60	0	2,80E+09	9,45	
	60	80	3,43E+03	3,54	5,91
2	60	0	8,67E+08	8,94	
	60	80	3,10E+04	4,49	4,45
3	60	0	7,53E+08	8,88	
	60	80	3,33E+01	1,52	7,35
4	60	0	4,97E+08	8,70	
	60	80	2,77E+03	3,44	5,25
5	30	0	5,93E+08	8,77	
	30	80	1,23E+03	3,09	5,68
	60	80	4,37E+03	3,64	5,06
6	30	0	4,00E+08	8,60	
	30	80	8,53E+03	3,93	4,67
	60	0	4,90E+08	8,69	
7	60	80	1,67E+02	2,22	6,47
	30	0	8,97E+08	8,95	
8	30	80	2,70E+05	5,43	3,52
	30	0	6,90E+08	8,84	
	30	80	6,67E+03	2,82	6,01

Obs: em negrito estão marcados os micro-organismos usados para o desafio subsequente
*controle comparado as demais concentrações

Fonte: Elaboração própria.

Após o oitavo desafio, os micro-organismos que sobreviveram foram considerados tolerantes ao H₂O₂, e foram usados para a realização dos experimentos.

5.2 Análise Microbiológica e Bioquímica do Biofilme

Na tabela 3 estão apresentadas as médias e o desvios padrão da contagem de *S. mutans* em Log_{10} de UFC+1/mL, da concentração de ácido láctico em biofilmes formados sobre lamínulas de vidro, e do pH do meio de cultura, bem como o resumo da análise estatística realizada.

A ANOVA a um fator com correção de Welch apontou diferença significativa na contagem de *S. mutans* para os diferentes grupos ($p < 0,001$, $\text{Eta} = 0,869$). A comparação dos grupos entre si pelo teste de Games-Howell mostrou que a contagem de *S. mutans* foi significativamente inferior no grupo GTcPH ($p < 0,001$), e não houve diferença entre os grupos GC e GTsPH ($p = 0,430$).

Para os valores de pH, houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA a um fator, com correção de Welch; $p < 0,001$, $\text{Eta} = 0,994$). Na comparação dos grupos dois a dois não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GC e GTsPH (Games-Howell; $p = 0,214$), e ambos mostraram valores de pH significativamente inferiores ao grupo GTcPH (Games-Howell; $p < 0,001$)

Para a quantificação da concentração de ácido láctico houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA a um fator, com correção de Welch; $p < 0,001$, $\text{Eta} = 0,794$), sendo a concentração maior em GC, seguido pelo grupo GTsPH, e, o grupo GTcPH foi o que produziu a menor quantidade do ácido láctico (Games-Howell; $p < 0,001$).

Tabela 3 - Quantificação de *S. mutans*, valores de pH do meio e concentração de ácido láctico em biofilmes de cinco dias de *S. mutans*

Grupo	Log10 de UFC de <i>S. mutans</i> +1/mL	pH do meio de cultura no dia 5	Concentração de ácido láctico ($\mu\text{mol/mL}$)
GC	7,96 \pm 0,18 ^a	4,09 \pm 0,04 ^b	4,25 \pm 1,29 ^a
GTsPH	7,82 \pm 0,31 ^a	4,01 \pm 0,16 ^b	1,97 \pm 0,93 ^b
GTcPH	2,03 \pm 1,91 ^b	6,88 \pm 0,06 ^a	0,02 \pm 0,02 ^c

Valores correspondem a média e desvio-padrão (n=12)

GC= Grupo controle, cepa padrão UA 159; GTsPH= Grupo de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio, sem peróxido de hidrogênio no meio de cultura; GTcPH= Grupo de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio, com peróxido de hidrogênio no meio de cultura. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% (ANOVA com correção de Welch seguida do pós-teste de Games-Howell; $p < 0,001$).

Fonte: Elaboração própria.

A Biomassa (peso seco) do biofilme e a concentração de proteínas não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos GC e GTsPH (teste *t* de Student; $p=0,051$ e $p=0,065$). Entretanto, a concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água no biofilme foi significativamente maior no grupo GC em relação ao grupo GTsPH (teste *t* de Student; $p=0,040$), (Tabela 4).

Tabela 4 - Biomassa (peso seco), quantidade de proteínas e de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água em biofilmes de cinco dias de *S. mutans*

Grupo	Peso seco (mg)	Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco de biofilme)	Polissacrídeos extracelulares insolúveis em água($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco de biofilme)*
GC	2,85 \pm 0,51 ^a	238,84 \pm 79,98 ^a	2,20 \pm 0,36 ^a
GTsPH	2,28 \pm 0,76 ^a	180,66 \pm 66,24 ^a	1,87 \pm 0,40 ^b
GTcPH	nq	nq	nq

Valores correspondem a média e desvio-padrão (n=12)

GC= Grupo controle, cepa padrão UA 159; GTsPH= Grupo de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio, sem peróxido de hidrogênio no meio de cultura; GTcPH= Grupo de *S. mutans* tolerante ao peróxido de hidrogênio, com peróxido de hidrogênio no meio de cultura; nq= não quantificado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% (*t* de Student; *p=0,040).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A literatura tem mostrado uma menor prevalência de cárie em crianças com síndrome de Down comparado com crianças não sindrômicas^{21,28,50}. Embora a cárie seja considerada uma doença multifatorial, biofilme-carboidratos dependente^{10,11}, a sua baixa prevalência tem sido associada a um menor número de *S. mutans* na saliva desses indivíduos^{21,22} ou à colonização por *S. mutans* com perfil genotípico com comportamento fenotípico menos cariogênico²³.

Indivíduos com síndrome de Down apresentam um desequilíbrio no sistema pró e antioxidante^{18,19,24}. Isso pode ser relacionado ao fato de o gene da principal isoenzima da superóxido dismutase (SOD-1), envolvida na conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, estar localizado no braço longo do cromossomo 21²⁵. Com a expressão aumentada dessa isoenzima²⁶, ocorre uma superprodução de peróxido de hidrogênio, o qual não é totalmente neutralizado e fica acumulado no organismo desses indivíduos¹⁷⁻²⁰. Esse acúmulo leva a um estresse oxidativo que resulta em produtos como o malondialdeído (MDA), um importante indicador de danos oxidativos que tem sido detectado em níveis elevados no sangue^{18,19} e na saliva de indivíduos com síndrome de Down²⁹⁻³¹.

Neste contexto, surge a questão se a menor prevalência de cárie nos indivíduos com síndrome de Down pode estar relacionada com uma maior concentração de H₂O₂ na sua cavidade bucal, afetando a formação do biofilme. Assim, no presente estudo foi desenvolvida uma cepa de *S. mutans* tolerante ao H₂O₂ e demonstrou-se a influência do estresse oxidativo com H₂O₂ na formação e em fatores de virulência de biofilmes formados com esta cepa.

O biofilme bucal compreende uma grande variedade de micro-organismos¹, que em condições ambientais favoráveis mantem-se em equilíbrio, determinando a saúde³⁵. Entretanto, quando o ambiente bucal se torna abundante em carboidratos, o equilíbrio é rompido criando condições para as espécies patogênicas competirem com a microbiota comensal, podendo levar ao desenvolvimento da doença^{9,35}.

As bactérias que colonizam a cavidade bucal são constantemente expostas a fatores de estresse de origem intra e extracelular, sendo o próprio metabolismo bacteriano e a dieta do hospedeiro os principais responsáveis por gerar fatores de estresse ácido, espécies reativas de oxigênio e outros agentes com potencial de

causar injúrias a biomoléculas. A capacidade de tolerar a esses tipos de estresse é determinante na definição da virulência de uma cepa bacteriana³⁶.

S. mutans tem um papel importante no desenvolvimento da cárie dental¹¹, atribuído a sua capacidade de metabolizar uma grande variedade de carboidratos, produzindo polissacarídeos extracelulares e ácido láctico, e tolerar níveis de pH extremamente baixos³³. Além disso, *S. mutans* tem a capacidade de se adaptar rapidamente as condições de estresse ambientais, o que permite a competição com outros micro-organismos, bem como o seu estabelecimento e manutenção no biofilme^{9,36}.

Para competir com as demais bactérias no biofilme, *S. mutans* tem que lidar com estresse oxidativo, e apesar de não ter a capacidade de produzir a enzima catalase, a principal enzima protetora contra injúrias oxidativas, apresenta diversas vias de neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS), que possibilitam a desativação enzimática, e também tem a capacidade de se associar com outras bactérias tolerantes ao estresse oxidativo, até se tornar numericamente significativa e tornar o biofilme mais patogênico^{32,36}.

No biofilme monoespécie de *Streptococcus*, como no modelo usado neste estudo, o estresse oxidativo é minimizado devido a redução do metabolismo de oxigênio pela bactéria, e conseqüentemente, da produção de espécies reativas de oxigênio. Esta estratégia pode ser considerada importante para a sobrevivência do micro-organismo, com uma baixa taxa de crescimento num ambiente competitivo como o biofilme³⁴.

O H₂O₂ usado no presente estudo com o intuito de induzir a formação de uma cepa tolerante, é considerado uma importante fonte endógena de estresse oxidativo para bactérias bucais¹³ e tem um papel importante na ecologia do biofilme¹². Produzido por vários membros do gênero *Streptococcus*, entre eles *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*¹³, o H₂O₂ exerce um efeito inibitório sobre *S. mutans*⁹. Tem sido mostrado que *S. sanguinis* prevalece em número sobre *S. mutans*, em biofilmes bucais de indivíduos livres de cárie^{5,37,45}. Entretanto, como muitas variáveis afetam a dinâmica do biofilme oral, não pode ser afirmado que a alta produção de H₂O₂ por *S. sanguinis* seja o único fator responsável pela inibição de *S. mutans*.

Para atingir os objetivos do presente estudo, foi necessário padronizar a concentração de H₂O₂ e o tempo que esta iria permanecer em contato com o micro-organismo. Num primeiro estudo piloto, uma cultura da cepa padrão de *S. mutans*

UA159 em suspensão, foi submetida a tratamento usando concentrações de H₂O₂ que variaram de 0,4 mM a 10 mM¹³, porém mesmo com a maior concentração usada houve uma log redução de UFC muito pequena. Baseado nesses resultados, optou-se por testar concentrações bem mais altas de H₂O₂ (40 mM, 80 mM e 160 mM)¹³, e os tempos de 30 e 60 minutos de incubação. Na concentração de 80 mM (0,223% de H₂O₂) e tempo de exposição de 60 minutos houve uma redução de aproximadamente 6 log na quantificação de micro-organismos que se manteve com o uso de H₂O₂ na concentração de 160 mM. Assim, foi definido o uso do H₂O₂ na concentração de 80 mM e o tempo de exposição de 60 minutos para a realização dos desafios. Após um total de oito desafios, as colônias sobreviventes foram consideradas tolerantes e foram usadas para o desenvolvimento do experimento de biofilme.

Apesar de não apresentar toxicidade elevada, o H₂O₂ é um efetivo antimicrobiano por ser substrato para a geração de espécies tóxicas que podem determinar alterações celulares irreversíveis por danos na membrana lipídica, em proteínas e distúrbios no DNA. Sua natureza tóxica aguda leva a questão de como *S. mutans* responde ao H₂O₂ que se acumula no microambiente do biofilme⁴⁴.

Estudos genômicos, transcriptômicos e proteômicos tem proporcionado um melhor entendimento de como *S. mutans* responde as alterações ambientais^{5,41,44,47,46}.

A espécie *S. mutans* apresenta heterogeneidade genômica e diferentes comportamentos fenotípicos que refletem nas suas propriedades de virulência e na forma que cada cepa interage e compete com as bactérias comensais⁴⁶. Cornejo et al.⁴¹ fazendo sequenciamento genômico de uma coleção de cepas de *S. mutans*, encontraram 73 genes exclusivos, nos quais 49% das proteínas eram relacionadas com metabolismo de carboidratos, resistência ácida, adaptação ao estresse oxidativo e adesão aos tecidos do hospedeiro, e ressaltaram que pequenas diferenças no conteúdo genético podem resultar em grandes diferenças nas propriedades de virulência.

Apesar desse micro-organismo apresentar uma série de mecanismos de proteção contra o dano oxidativo^{32,34}, o H₂O₂ parece inibir a expressão de vários genes relacionados com a sua virulência⁴⁵. Kajfasz et al.⁴⁷ verificaram que proteínas reguladoras de estresse oxidativo (SpxA1 e SpxA2) presentes no *S. mutans* coordenam alterações transcricionais que modificam o seu metabolismo global e aumentam a produção de antioxidantes.

No presente estudo, o biofilme foi formado por espécie única de micro-organismo e foi usado o modelo de aderência ativa de Exterkate et al.³⁸, que evita a deposição e aderência dos micro-organismos pela força da gravidade. Verificou-se que a cepa tolerante ao H₂O₂ apresentou uma diminuição na expressão de fatores de virulência quando cultivada tanto na presença quanto na ausência do peróxido de hidrogênio. Estudos com biofilme de espécie única apesar de não refletirem as interações que ocorrem no biofilme bucal, são importantes por permitirem avaliar a resposta da cepa específica a alterações controladas a ela impostas.

Embora, no genoma de *S. mutans* estejam presentes vários genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em outras bactérias³⁴, existe pouca informação na literatura sobre o papel desses genes no desenvolvimento de tolerância desse micro-organismo ao estresse oxidativo. Segundo Liu et al.⁴⁶, na presença de H₂O₂, a cepa de *S. mutans* UA159 apresentou um crescimento significativamente mais lento comparado com o crescimento em condições livres de estresse, entretanto não houve diferença na densidade óptica máxima atingida. Avaliando a expressão de proteínas relacionadas com a neutralização do H₂O₂, verificaram que uma cepa de *S. mutans* sensível ao H₂O₂ (Smu81), expressou significativamente mais proteínas relacionadas com o estresse oxidativo do que a cepa UA159 (controle), tanto na ausência quanto na presença de 250 µM de H₂O₂ no meio de cultura por 15 minutos. Segundo Kajfasz et al.⁴⁷ (2017) essa foi a única cepa entre 57 estudadas que mostrou mutações no gene *spxA*, o que explica parcialmente a sua sensibilidade ao H₂O₂.

No presente estudo, o biofilme formado pela cepa tolerante ao peróxido de hidrogênio em contato com o meio de cultura contendo 80 mM de H₂O₂ (grupo GTcPH), apresentou um menor número estatisticamente significativo de UFC/mL e menor concentração de ácido láctico em relação ao grupo controle. Esse resultado corrobora com os resultados de Baldeck e Marquis¹³, que usando o H₂O₂ em concentrações elevadas (acima de 30 mmol/L), verificaram que este apresentava um efeito bactericida, sendo a síntese de proteínas o principal alvo do dano causado, o que tornava as células incapazes de reparar ou substituir as proteínas danificadas.

O biofilme formado com a cepa tolerante em meio de cultura sem H₂O₂ (GTsPH), por sua vez, não mostrou diferença em relação ao grupo controle quanto ao número de UFC/mL, pH do meio, biomassa e concentração de proteína total. Entretanto, neste grupo houve uma menor produção significativa de ácido láctico e de

polissacarídeos extracelulares insolúveis em água. A produção de ácido láctico é um dos principais fatores de virulência que determinam o potencial cariogênico do micro-organismo^{10,11}. Portanto, uma redução na produção de ácido láctico como ocorreu no biofilme formado com a cepa de *S. mutans* tolerante ao H₂O₂ pode ser indicativo de alterações na sua estrutura tornando-o menos cariogênico.

S. mutans é o principal micro-organismo produtor de polissacarídeos extracelulares (EPS), que desempenham um papel estrutural essencial para a formação da matriz de biofilmes cariogênicos^{40,42}. Embora o modelo de biofilme mono-espécie usado neste estudo não reproduza a comunidade microbiana complexa do biofilme dental, esses resultados sugerem que os micro-organismos tolerantes ao H₂O₂ tiveram a formação do biofilme afetada, pois a menor produção de polissacarídeos interfere na formação de matriz extracelular podendo indicar uma redução na virulência determinada por alterações promovidas pelo H₂O₂.

Apesar das limitações deste estudo devido ao fato de o biofilme ter se formado *in vitro* usando espécie bacteriana única, os resultados obtidos parecem suportar a hipótese de que existe uma forte relação entre elevados níveis de H₂O₂ e redução dos fatores de virulência de *S. mutans*. Embora, não se possa afirmar que a menor prevalência de cárie em indivíduos com SD seja devido exclusivamente a elevada produção e acúmulo de H₂O₂ no seu organismo, por esta ser considerada uma doença multifatorial e por existirem vários fatores afetando a dinâmica de formação do biofilme dentário, esses resultados representam uma contribuição importante na tentativa de elucidar os fatores relacionados com uma menor prevalência de cárie dentária em indivíduos com síndrome de Down.

Além disso, ressalta-se que o fato de o número de micro-organismos e a quantificação de proteínas ter sido semelhante nos grupos controle (cepa padrão UA159) e GTsPHP (cepa tolerante em meio de cultura sem de H₂O₂), não significa que esses micro-organismos tenham o mesmo potencial para desencadear a doença. Portanto, outros trabalhos devem ser realizados no sentido de compreender melhor as alterações que a espécie *S. mutans* sofre para se tornar tolerante ao estresse oxidativo, bem como se as alterações nas características que determinam a sua virulência podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias preventivas e de tratamento da doença cárie.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1- a presença de peróxido de hidrogênio no meio interferiu significativamente na formação do biofilme e na produção de ácido láctico pela cepa tolerante;
- 2- não houve alteração na viabilidade bacteriana nos biofilmes formados pela cepa tolerante quando esta foi cultivada na ausência de peróxido de hidrogênio;
- 3- a produção de ácido láctico e a concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água foram significativamente reduzidas quando a cepa tolerante foi cultivada na ausência de peróxido de hidrogênio;
- 4- a cepa tolerante ao peróxido de hidrogênio apresentou uma diminuição na expressão de fatores de virulência quando cultivada tanto na presença quanto na ausência do peróxido de hidrogênio.

REFERÊNCIAS*

1. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Wen-Han Y et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010; 192(19): 5002-17.
2. Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of Streptococci and Actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol.* 2003; 185(11): 3400-9.
3. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *J Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(4): 471-80.
4. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiol.* 2005; 13: 589-95.
5. Kreth J, Zang Y, Herzberg CM. Streptococcal antagonism in oral biofilms: Streptococcus sanguinis and Streptococcus gordonii interference with Streptococcus mutans. *J Bacteriol.* 2008; 190(13): 4632-40.
6. Xiao C, Ran S, Huang Z, Liang J. Bacterial Diversity and Community Structure of Supragingival Plaques in Adults with Dental Health or Caries Revealed by 16S P, yrosequencing. *Original Research.* 2016; 1145(7): 1-15.
7. Rosan B, Lamont JR. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000; 2: 1599-607.
8. Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis.* 2010; 16: 729-39.
9. Kreth J, Merrit J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005; 187: 7193-203.
10. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90(3): 294-303.
11. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol.* 2017.
12. Barnard JP, Stinson MW. Influence of environmental conditions on hydrogen peroxide formation by Streptococcus gordonii. *Infect Immun.* 1999; 67: 6558-64.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Baldeck DJ, Marquis ER. Targets for hydrogen-peroxide-induced damage to suspension and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *J Microbiol*. 2008; 54: 868-75.
14. Carlsson J. Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J Oral Pathol*. 1987; 16(8): 412-6.
15. Ashby MT. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *J Dent Res*. 2008; 87(10): 900-14.
16. Switala J, Loewen P.C. Diversity of properties among catalases. *Arch Biochem Biophys*. 2002; 401:145-54.
17. Jovanovic SV, Clements D, MacLeod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25(9): 1044-8.
18. Pinto M, Neves J, Palha M, Bicho M. Oxidative stress in Portuguese children with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract*. 2002; 8(2): 79-82.
19. Garcez ME, Peres W, Salvador M. Oxidative stress and hematologic and biochemical parameters in individuals with Down syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2005; 80 (12): 1607- 11.
20. Muchová J, Zitnanová I, Duracková Z. Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy? *Physiol Res*. 2014; 63(5): 535-42.
21. Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist*. 1991; 11(5): 203-7.
22. Areias C, Sampaio-Maia B, Pereira ML, Azevedo A, Melo P et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. *Clin*. 2012; 67(9): 1007-11.
23. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down syndrome. *Arch Oral Biol*. 2006; 51: 177-82.
24. Kedziora J, Bartosz G. Down's Syndrome: A pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 1988; 4: 317-30.
25. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. 2000; 405: 311-9.

26. De La Torre R, Casado A, López-Fernández E, Carrascosa D, Ramírez V, Sáez J. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experimental*. 1996; 52(9): 871-3.
27. Siqueira WL, Nicolau J. Simulated whole saliva component in children with Down syndrome. 2002; 22(6): 226-30.
28. Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J, Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of down syndrome children to healthy children. *Int J Paediatr Dent*. 2010; 20: 235-41.
29. Komatsu T, Duckyoung Y, Ito A, Kurosawa K, Maehata Y, Kubodera T, et al. Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(9): 1246-50.
30. Sousa MC, Vieira RB, Dos Santos DS, Carvalho CA, Camargo SE, Mancini MN, et al. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. *Arch Oral Biol*. 2014; 60(4): 600-5.
31. Domingues NB, Mariusso MR, Tanaka MH, Scarel-Caminaga RM, Mayer MPA, Brighenti FL, Zuanon ACC, Ibuki FK, Nogueira FN, Giro EMA. Reduced salivary flow rate and high levels of oxidative stress in whole saliva of children with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2017; 37(6): 269-76.
32. Marquis RE. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J Ind Microbiol*. 1995; 15(3): 198-207.
33. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(22): 14434-9.
34. Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol*. 2005; 7(1): 95-107.
35. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community –implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006; 6 (1): S14.
36. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2008; 154 (11): 3247-55.
37. Ge Y, Caufield PW, Fisch GS, Li Y. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res*. 2008; 42(6): 444-8.
38. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010; 44 (4): 372–9.
39. Lemos JA, Abranches J, Koo H, Marquis RE, Burne RA. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods Mol Biol*. 2010; 666: 87-102.

40. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192(12): 3024-32.
41. Cornejo OE, Lefébure T, Bitar PD, Lang P, Richards VP, Eilertson K, Do T, Beighton D, Zeng L, Ahn SJ, Burne RA, Siepel A, Bustamante CD, Stanhope MJ. Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(4): 881-93.
42. Klein MI, Hwang G, Santos PH, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5:10.
43. Zhu L, Kreth J. The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. *Oxidative Med Cell Longev.* 2012; 2012: 1-10.
44. Xu Y, Itzek A, Kreth J. Comparison of genes required for H₂O₂ resistance in *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis*. *Microbiol.* 2014; 160: 2627-38.
45. Giacaman RA, Torres S, Gómez Y, Muñoz-Sandoval C, Kreth J. Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization and ex vivo hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(1):154-9.
46. Liu Y, Palmer SR, Chang H, Combs AN, Burne RA, Koo H. Differential oxidative stress tolerance of *Streptococcus mutans* isolates affects competition in an ecological mixed-species biofilm model. *Environ Microbiol Rep.* 2018; 10(1):12-22.
47. Kajfasz JK, Ganguly T, Hardin EL, Abranches J, Lemos JA. Transcriptome responses of *Streptococcus mutans* to peroxide stress: identification of novel antioxidant pathways regulated by Spx. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 16018.
48. Gutmann I, Wahlefeld AW. *Methods of Enzymatic Analysis.* Verlag Chemie, Weinheim. 1974; 2: 1510-14.
49. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28(3): 350–356.
50. Cogulu D, Sabah E, Kutukculer N, Ozakinay F. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 23-8.

APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, _____, (nacionalidade) _____, portador do RG nº _____, residente à _____, na cidade de _____, estado de _____, fui convidado e concordo em participar da pesquisa “Influência do peróxido de hidrogênio na formação e virulência de biofilmes de *Streptococcus mutans*”, de responsabilidade da Profª. Drª. Elisa Maria Aparecida Giro, da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não me restarem quaisquer dúvidas sobre a participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- A referida pesquisa tem por objetivo gerar bactérias conhecidas como *Streptococcus mutans* que sejam resistentes a um produto denominado peróxido de hidrogênio (que é espécie reativa de oxigênio), e avaliar a habilidade deste produto em afetar a formação e a virulência de biofilmes (aglomerados de bactérias aderidas a uma superfície) dessa espécie de bactéria.
- Para participar da pesquisa passarei por um exame clínico da boca, com luz do refletor, sonda clínica e espelho bucal, e, em seguida, serei submetido à coleta de saliva, que será feita usando um copo descartável mantido em um recipiente com gelo.
- Para a doação de saliva, não poderei escovar os dentes, ingerir alimentos ou líquidos por 2 horas antes da coleta. A minha salivagem será estimulada por meio da mastigação de um pedaço de plástico (Parafim), um material inerte que não causa prejuízo à saúde.
- Não sofrerei dor por submeter-se ao exame clínico, nem para a coleta de saliva; e não haverá nenhum risco para a minha saúde, pois serão utilizados materiais descartáveis e instrumentais estéreis.
- Não terei contato com a bactéria *Streptococcus mutans* e nem com o produto peróxido de hidrogênio usados no estudo, pois a saliva coletada será congelada para posteriormente ser usada pelos pesquisadores para a realização do estudo em laboratório.
- Estou ciente que estarei contribuindo espontaneamente para a realização de uma pesquisa que trará informações para melhor compreensão da cárie dental, podendo resultar em benefícios para a população de uma forma geral.
- Estou ciente que receberei orientação de correta escovação dental e outras medidas para a manutenção da saúde bucal, e que após a doação da saliva, será feita uma limpeza profissional dos meus dentes. Mas mesmo que eu não concorde em participar da pesquisa, se eu apresentar alguma alteração bucal serei encaminhado para a realização do tratamento necessário.

- Estou ciente que receberei esclarecimento sobre qualquer dúvida acerca de assuntos relacionados a pesquisa, e além disso possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.
 - Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, porém, será mantido a todo instante o sigilo da minha identidade, assegurando a minha privacidade.
 - Estou ciente que a participação na pesquisa será voluntária e não será oferecido nenhum tipo de remuneração, e que os eventuais gastos com transporte e alimentação serão ressarcidos pelos pesquisadores.
 - Estou ciente que receberei uma via assinada e datada deste documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”.
- Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

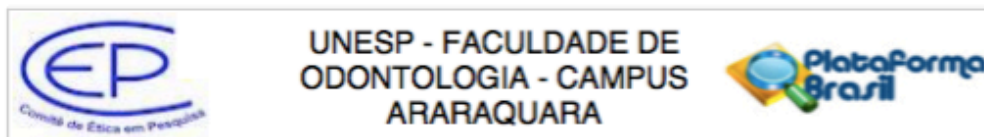
Professor Responsável: Elisa Maria Aparecida Giro

Telefones para contato:

Telefone do Pesquisador Responsável: (16) 3301 – 6336 / 991867523

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa: FOAr – (16) 3301- 6432/6434

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do Peróxido de Hidrogênio na Formação e Virulência de Biofilmes de *Streptococcus mutans*.

Pesquisador: Elisa Maria Aparecida Giro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64746217.5.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.968.153

Apresentação do Projeto:

Influência do Peróxido de Hidrogênio na Formação e Virulência de Biofilmes de *Streptococcus mutans*.

Objetivo da Pesquisa:

Gerar cepas de *Streptococcus mutans* resistentes ao Peróxido de Hidrogênio, e avaliar, in vitro, a formação de biofilmes com essas cepas, bem como fatores relacionados com a sua virulência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os voluntários farão apenas a doação da saliva, e eventuais riscos de contaminação serão minimizados pelo uso de materiais estéreis e descartáveis. Com relação aos pesquisadores, durante todas as etapas da pesquisa serão utilizados os equipamentos de proteção individual (jalecos, luvas, gorros, máscaras e óculos de proteção), bem como materiais descartáveis, minimizando os possíveis riscos de contaminação. Os reagentes com potencial de toxicidade (como o fenol e o ácido sulfúrico, por exemplo) utilizados durante a análise bioquímica do biofilme formado sobre os discos de hidroxiapatita, serão manipulados em capela com exaustão.

Benefícios: Após a coleta da saliva, os voluntários receberão profilaxia dental e instruções de higiene bucal, realizada por um dos colaboradores da pesquisa. Isso só será informado para os

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

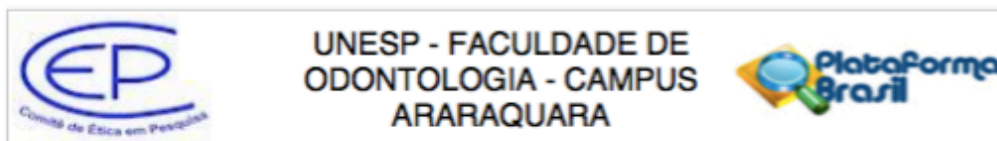
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

Município: ARARAQUARA

E-mail: cep@foar.unesp.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do Peróxido de Hidrogênio na Formação e Virulência de Biofilmes de *Streptococcus mutans*.

Pesquisador: Elisa Maria Aparecida Giro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64746217.5.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.968.153

Apresentação do Projeto:

Influência do Peróxido de Hidrogênio na Formação e Virulência de Biofilmes de *Streptococcus mutans*.

Objetivo da Pesquisa:

Gerar cepas de *Streptococcus mutans* resistentes ao Peróxido de Hidrogênio, e avaliar, in vitro, a formação de biofilmes com essas cepas, bem como fatores relacionados com a sua virulência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os voluntários farão apenas a doação da saliva, e eventuais riscos de contaminação serão minimizados pelo uso de materiais estéreis e descartáveis. Com relação aos pesquisadores, durante todas as etapas da pesquisa serão utilizados os equipamentos de proteção individual (jalecos, luvas, gorros, máscaras e óculos de proteção), bem como materiais descartáveis, minimizando os possíveis riscos de contaminação. Os reagentes com potencial de toxicidade (como o fenol e o ácido sulfúrico, por exemplo) utilizados durante a análise bioquímica do biofilme formado sobre os discos de hidroxiapatita, serão manipulados em capela com exaustão.

Benefícios: Após a coleta da saliva, os voluntários receberão profilaxia dental e instruções de higiene bucal, realizada por um dos colaboradores da pesquisa. Isso só será informado para os

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

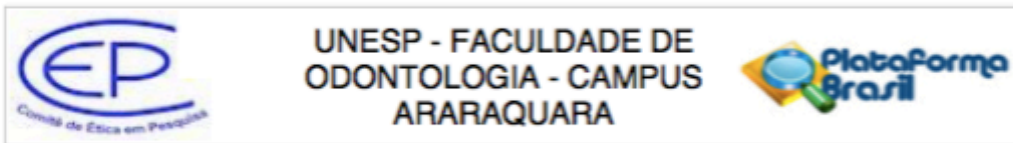
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.968.153

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_responsavel_pela_clinica.pdf	11/02/2017 18:55:47	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	11/02/2017 18:55:17	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Chefe_Departamento.pdf	11/02/2017 18:52:58	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	11/02/2017 18:21:23	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 16 de Março de 2017

Assinado por:
Lígia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 CEP: 14.801-903 E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 26/03/2020

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 26 de março de 2018

Paula Pereira Zenaro