

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/03/2020.



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.

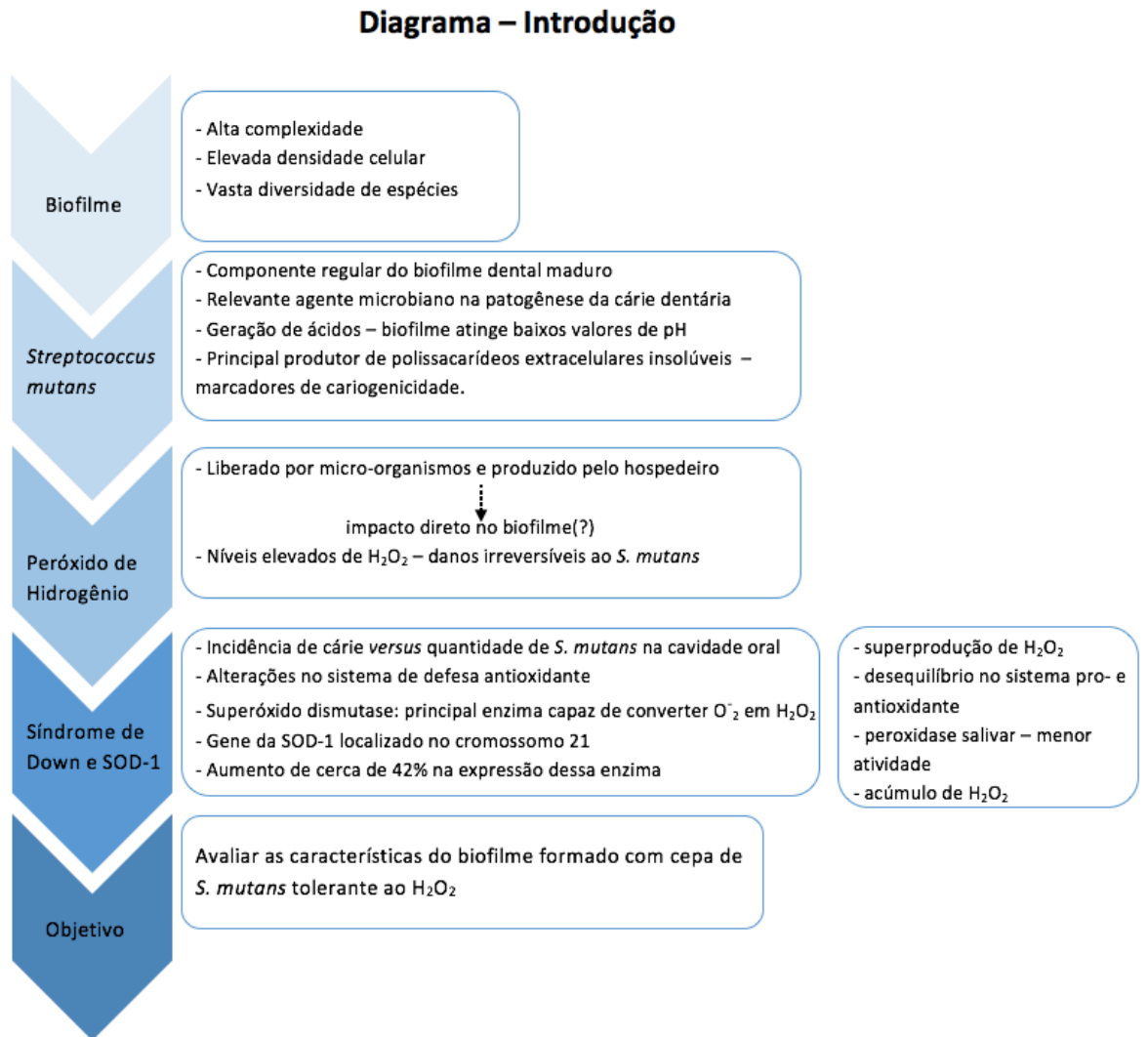
O H_2O_2 é liberado por alguns micro-organismos incluindo estreptococos bucais¹³, e também é produzido pelo hospedeiro¹⁴. Porém, até o momento, não se tem conhecimento se essa produção pelo hospedeiro tem um impacto direto no biofilme, uma vez que o H_2O_2 é transitório na cavidade bucal, devido a efetiva 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.

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.