

RUCHELE DIAS NOGUEIRA

**Estudo prospectivo da resposta imunológica de crianças brasileiras
altamente expostas ao *Streptococcus mutans*: influência da especificidade da
resposta imune na infecção.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Buco Dental. Área de Microbiologia e
Imunologia.

Orientador(a): Renata de Oliveira Mattos Graner

PIRACICABA

2006

N689e

Nogueira, Ruchelee Dias.

Estudo prospectivo da resposta imunológica de crianças brasileiras altamente expostas ao *Streptococcus mutans*: influência da especificidade da resposta imune na infecção. / Ruchelee Dias Nogueira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos-Graner.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Sistema imune. 2. Imunoglobulina A. 3. Infecção.
I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira. I. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Prospective study of immune response in brazilian children heavily exposed to *Streptococcus mutans*: influence of specific immune response in infection
Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Immune system. 2. Immunoglobulin A. 3.

Infection

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco Dental

Banca Examinadora: Renata de Oliveira Mattos-Graner, Célia Regina Whitaker Carneiro, Marcia Pinto Alves Mayer, Reginaldo Bruno Gonçalves, José Francisco Höfling
Data da Defesa: 11-10-2006

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 11 de Outubro de 2006, considerou a candidata RUCHELE DIAS NOGUEIRA aprovada.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Renata de Oliveira Mattos Graner", written over a horizontal line.

PROF.ª DRa. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Célia Regina Whitaker Carneiro", written over a horizontal line.

PROF.ª DRa. CÉLIA REGINA WHITAKER CARNEIRO

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Marcia Pinto Alves Mayer", written over a horizontal line.

PROF.ª DRa. MARCIA PINTO ALVES MAYER

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Reginaldo Bruno Gonçalves", written over a horizontal line.

PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONÇALVES

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Jose Francisco Hofling", written over a horizontal line.

PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, **Vitor** e **Rozimeire**, pelo amor incondicional, espírito de luta e honra;

Aos meus irmãos **Raquele** e **Randal** pela aliança fraternal, carinho e respeito;

Ao meu tio **Antônio Dias Cordeiro** (*in memoriam*) por sempre acreditar na minha capacidade e por sua vontade de viver intensamente.

Em especial, ao meu marido **Vinícius**, pela paciência, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

EM ESPECIAL,

À Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos Graner,

minha profunda gratidão a tudo que me ensinou, ao incentivo, apoio e principalmente pela confiança.

À amiga, Alessandra Castro Alves,

pelo seu companheirismo nas visitas às creches, pelo entusiasmo contagiante com que leva a vida e pelas músicas tocadas para animar mais um dia de trabalho;

Ao Prof. Dr. Daniel J. Smith,

pela educação, carinho, receptividade e principalmente pela sua generosidade com que me recebeu no The Forsyth Institute, Boston, Estados Unidos. Exemplo de respeito e dedicação à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor Prof. Dr. **José Tadeu Jorge** e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP/UNICAMP, por meio do Diretor **Prof. Dr. Francisco Haíter Neto**, pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. **Mário Alexandre Coelho Sinhoreti** e das secretárias, **Érica A. Pinho Sinhoreti**, **Raquel Q. Marcondes Cesar Sacchi** e **Tatiane Cristina Gava**.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco Dental, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. **Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria**, pela organização exemplar do curso, disponibilidade e competência.

Aos professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, **Prof. Dr. José Francisco Hofling** e **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves** pelas suas experiências e ensinamentos.

Aos amigos do curso de Pós Graduação de Biologia Buco Dental, **Marlise Inez Klein**, **Rafael Nóbrega Stipp**, **Rita de Cássia Mardegan**, **Regianne Umeko Kamya**, **Vivian Fernandes Furletti**, **Iriana Carla Junqueira Zanin**, **Priscilla de Laet Sant'anna Mariano**, **Gustavo Alberto Obando Pereda**, **Thais de Cassia Negrini**, **Paula Cristina Anibal**, **Cristiane Duque**, **Letícia Monteiro de Barros**, **Daniel Saito**, **Janaina A. O. Rodrigues**, pela companhia, ajuda e exemplos de dedicação.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga**, pela valiosa ajuda nos momentos iniciais de execução dos experimentos e pela amizade.

Aos funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, da FOP/UNICAMP, **Anderson Laerte Teixeira**, **Wilma C. Ferraz** e **Flávia Pampolini**, pelo carinho e presteza durante todos estes anos de convívio.

Aos professores, funcionários e colegas da Disciplina de Patologia da FOP/UNICAMP pela receptividade e atenção. Em especial, a pós graduanda, **Michelle Agostini**, pela sua amizade, presteza e companheirismo tanto no Brasil como nos Estados Unidos durante meu estágio no exterior.

Aos professores do The Forsyth Institute, Boston, Estados Unidos, **Prof. Dr. Martin A. Taubman** e **Prof. Dr. Toshihisa Kawai**, pela atenção, incentivo e preocupação.

Aos funcionários do The Forsyth Institute, Boston, Estados Unidos, em especial, ao **Dr. Willian F. King**, pela sua paciência, carinho e hospitalidade com que me recebeu durante meu estágio no exterior.

AGRADECIMENTOS

Às minhas eternas amigas, **Ângela Cardoso de Oliveira, Talita Cristina Rossi e Letícia Fernandes** pela convivência em Araraquara durante a minha graduação na UNESP.

À amiga **Isabel Maria Porto** pela companhia diária, pelo seu dinamismo e responsabilidade, e por ser a minha família de Piracicaba.

À amiga Profa. Dra. **Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho**, por ser verdadeira e se doar sempre e por me ensinar a magia da pesquisa.

Aos professores doutores **Denise Madalena Palomari Spolidório e Luis Carlos Spolidório** pela amizade, pela bondade e confiança sempre depositada em mim.

À Profa. Dra. **Kristianne Porta Fernandes** pela confiança no meu trabalho como docente, por me dar a oportunidade de colocar em prática o que aprendi na minha carreira.

Aos meus sogros **José Francisco Almeida Geraldo Martins e Maria Rangel Geraldo Martins** pela generosidade e pela dedicação a sua família.

À todos os meus familiares que sempre apoiaram a minha carreira e me incentivaram a vencer os desafios.

Aos professores da banca examinadora, que prontamente aceitaram participar desta nova etapa da minha carreira.

Ao Setor de Saúde Escolar da Secretaria da Educação do município de Piracicaba, através da **Sra. Sueli Aparecida de Araújo Pereira**, que apoiou incondicionalmente este projeto.

Às agentes de saúde das EMEIs estudadas, em especial à **Cláudia Regina Ferreira**, pelo seu bom humor e pelo apoio durante o estudo de campo.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo incentivo a minha pesquisa e pelo apoio financeiro (Processos no.04/07425-8 e 02/07156-1).

Aos voluntários, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho

Meus sinceros agradecimentos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis".*

Fernando Pessoa

RESUMO

Streptococcus mutans (SM) são os principais patógenos da cárie dental. Neste estudo exploramos a influência do sistema imune de mucosa na infecção inicial pelo SM em crianças altamente expostas a este microrganismo. Cento e dezenove crianças, com idade inicial entre 5 a 13 meses de idade foram analisadas no início do estudo (T0) e após 6 (T6), 12 (T12) e 18 (T18) meses, amostras bucais foram coletadas para determinação dos níveis de infecção por SM, através do cultivo em mitis salivarius ágar com bacitracina. Os níveis de IgA, IgA1 e IgM foram também determinados em amostras de saliva, através de ensaios de ELISA. Um subgrupo de 21 crianças infectadas por SM (entre T0 e T6) foram pareadas a outras 21 crianças da amostra sem níveis detectáveis de SM. As reações entre anticorpos IgA da saliva com antígenos (Ags) de SM foram comparadas entre estes subgrupos, através de ensaios de western blot. A intensidade das bandas reativas foi determinada através da densitometria e expressas como unidades arbitrárias (ua). A reatividade de IgA salivar com peptídeos derivados da sequência da GbpB, preditos como regiões ligantes à MHC de classe II, foram também avaliados através de multiplex com o Luminex. Os níveis salivares de IgA aumentaram com a idade (de 82,4 a 823,4µg/ml), enquanto que os níveis de IgM mantiveram-se baixos durante todo o estudo (média:4,2-2,8 µg/ml). Os níveis de infecção por SM foram maiores em T6 (média:45 ufc/área) e uma forte resposta de IgA aos Ags de SM pôde ser detectada logo aos 6 meses de idade. A resposta de IgA anti-GbpB foi observada em 38% das 21 crianças infectadas por SM, enquanto que 73% dos pares não infectados apresentavam estes anticorpos (Qui-quadrado, $p<0.03$). Um pico de resposta de IgA a GbpB ocorreu durante a fase de maior desafio de infecção (T6). Não houve diferenças significativas nos padrões de reatividade de IgA aos diversos peptídeos de GbpB testados, entre os grupos de crianças infectadas e não infectadas por SM. Os resultados indicam que uma resposta complexa de IgA a SM pode ocorrer a partir dos 6 meses e que a especificidade de resposta a Ags envolvidos na virulência podem influenciar na susceptibilidade à infecção por SM. Nenhum dos peptídeos da GbpB correspondeu às intensidades de resposta à GbpB nativa observadas entre os pares de crianças estudados.

Palavras-chave: infecção inicial por *Streptococcus mutans*, sistema imune de mucosas

ABSTRACT

Mutans streptococci (MS) are the main pathogens of dental caries. In this study we explored the influence of the mucosal immune system in the initial colonization by MS in children highly exposed to this microorganism. A total of 119 children, who were of 5 to 13 months of age, were enrolled in this prospective study. MS levels of infection were determined in cultures on mitis salivarius agar with bacitracin at baseline (T0), 6 (T6), 12 (T12) and 18 months (T18)-of follow-up. Saliva samples were also collected at all phases of the study for determination of the levels of antibodies IgA, IgA1 and IgM in ELISA assays. A subset of 21 MS-infected early between T0 and T6 were matched to other 21 children, but who were not MS-infected. Patterns of IgA antibody reactivity to MS Ags were compared between these 21 pairs through assays of western blot. Intensities of IgA-reactive bands were determined densitometrically and were expressed as arbitrary unit (au). Reactivities of salivary IgA antibodies to peptides derived from the GbpB sequence, which were predicted as having affinity to MHC of class II molecules were evaluated in multiplex with the help of the Luminex technology. Levels of antibody IgA in saliva increased with age (82.4-823.35 µg/ml), while levels of IgM remained at low levels (mean:4.2-2.78 µg/ml). The highest levels of MS infection in the infected group were observed at T6 (mean:45 cfu/plate). Robust responses to SM antigens were detected in children as early as 6 months of age. Only 38% of early-infected children carried IgA-reactive GbpB while this antigen was recognized by the majority (73%) of children that were not infected by these microorganisms (chi-square, $p < 0.03$). A peak of IgA response to GbpB occurred during the phase of highest SM infectious challenge (by T6). All the GbpB-derived peptides have shown reactivity with salivary IgA, independently of the status of MS infection. The results indicated that complex salivary IgA responses to MS Ags can occur by 6 months of age and that the patterns of salivary IgA specificities might influence in the susceptibility of initial infections to MS. Neither of the peptides tested corresponded to differences in response to the native protein observed between the pairs of children studied.

Keywords: Initial infection to *Streptococcus mutans*, mucosal immune system

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
3. PROPOSIÇÃO	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
5. RESULTADOS	67
6. DISCUSSÃO	93
7. CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	115
ANEXOS	137

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus mutans (SM), principal patógeno da cárie dentária, apresentam um conjunto de fatores de virulência que os tornam capazes de se aderir e se acumular no biofilme dentário na presença de sacarose, desencadeando a desmineralização dos tecidos dentários, uma vez que estes microrganismos toleram e produzem grandes quantidades de ácidos, a partir do seu metabolismo.

Três grupos de antígenos (Ags) associados à superfície celular destes microrganismos têm sido amplamente estudados, pois participam do processo de aderência e acúmulo de SM no biofilme dentário. Estes incluem a adesina antígeno I/II (Ag I/II), as glucosiltransferases (Gtfs) e as proteínas ligantes de glucano (Gbp de *Glucan-binding protein*). As Gtfs catalisam a síntese extracelular de glucanos solúveis e insolúveis em água a partir da sacarose, sendo essenciais para o estabelecimento de SM no biofilme dentário (Hajishengallis & Michalek, 1999). Três enzimas Gtf, GtfB, GtfC e GtfD, foram identificadas nesta espécie bacteriana, sendo estas, os fatores de virulência mais estudados de SM. Pelo menos quatro Gbps são expressas por SM, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (revisado por Banas e Vickerman, 2003). Diversos estudos demonstraram que a imunização com Gtfs e GbpB confere proteção contra o desenvolvimento de cárie dentária, sob condições de alta exposição à sacarose em modelos animais (Smith & Taubman, 1996; Smith *et al.*, 1997; Jespersgaard *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2003a). Estes estudos permitiram a realização dos primeiros estudos clínicos, para viabilizar a aplicação destes Ags em vacinas anti-cárie em adultos e crianças (Smith & Taubman, 1990; Childers *et al.*, 1999).

Pouco se sabe sobre a influência da resposta imune adaptativa a Ags das Gtfs e das Gbps no estabelecimento de SM no biofilme dentário. Estudos são necessários para se

estabelecer uma relação entre a produção de anticorpos específicos a estes Ags e o processo de colonização bucal e virulência de SM em crianças, principalmente durante as fases de aquisição inicial destes microrganismos.

Embora o alto consumo de sacarose, freqüentemente promova intensa infecção por SM e quadros severos de cárie (Van Houte *et al.*, 1982), um grupo pequeno de indivíduos, altamente expostos à sacarose, não desenvolve esta doença. Em estudo anterior de crianças que freqüentavam creches públicas em Piracicaba (Escolas Municipais de Ensino Infantil – EMEIs), onde uma dieta rica em sacarose é oferecida, observou-se colonização precoce por SM (Mattos-Graner *et al.*, 2001a; Klein *et al.*, 2004). Altos níveis de infecção estiveram associados à alta incidência de cárie em um ano, mas um pequeno subgrupo de crianças altamente infectadas em idade precoce, não desenvolveu a doença (Mattos-Graner *et al.*, 2001a). Este subgrupo apresentou uma redução dos níveis iniciais de SM durante um ano de acompanhamento. Grandes oscilações nos níveis bucais de SM após os 30 meses de idade foram observados em outras populações de baixo risco de cárie (Smith *et al.*, 1998). Variações nas condições imunológicas e na virulência de genótipos de SM podem contribuir para estas observações.

Uma alta diversidade de padrões de anticorpos IgA salivares a Ags de SM entre crianças e adultos foi previamente descrita (Camling & Kohler, 1987; Bratthall *et al.*, 1997), mas até hoje não foram identificados padrões específicos de resposta associados à susceptibilidade a infecção. Uma das hipóteses exploradas no presente estudo foi a de que a intensidade e especificidade de resposta imune adaptativa a Ags de SM, envolvidos na sua virulência, poderiam inibir o estabelecimento destes microrganismos na cavidade bucal, durante a fase inicial de colonização.

O conhecimento do potencial imunológico em crianças e sua relação com a susceptibilidade de infecção podem fornecer dados importantes para o desenvolvimento de vacinas para o controle da cárie dental. Inúmeras formas de elaboração de vacinas anti-cárie vêm sendo desenvolvidas. Estudos com Ag I/II, Gtf e Gbps em ratos e macacos, através de imunizações sistêmicas, mucosas ou passivas parecem promissores. Em humanos, imunizações das mucosas oral e nasal de adultos e crianças com Gtf demonstraram aumento dos níveis salivares de IgA (Smith & Taubman, 1987) e IgA1 (Childers *et al.*, 1994; Childers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Childers *et al.*, 2003). Procura-se ainda, desenvolver Ags imunogênicos contendo domínios funcionais conservados de Gtfs e Gbps. Assim, a incorporação de domínios catalíticos das Gtfs, associados a peptídeos de GbpB com características de interação a moléculas MHC (de Major Histocompatibility Complex) de classe II parece potencializar o efeito da vacinação em modelos animais (Smith *et al.*, 2005). A identificação de domínios antigênicos naturalmente imunodominantes e com função protetora em humanos, pode ainda fornecer dados importantes na busca de uma vacina anti-cárie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Infecção inicial por microrganismos bucais.

Ao nascer, o recém nascido entra em contato com diversos microrganismos do ambiente. A cavidade oral é uma via primária de entrada de bactérias e outros microrganismos (Berkowitz *et al.*, 1980), e alguns destes, embora passem pelas mucosas, não são capazes de colonizá-las (Smith & Taubman, 1992). No entanto, outros microrganismos tornam-se residentes das superfícies mucosas, modificando-a e permitindo o estabelecimento de outros microrganismos. Desta maneira ocorre um aumento da complexidade das comunidades microbianas das mucosas (Marcotte & Lavoie, 1998). Estreptococos representam a maioria das bactérias que colonizam primeiramente a cavidade bucal, constituindo uma microbiota comensal. Algumas espécies de estreptococos são pioneiras por produzirem IgA1 proteases, glicosidases e adesinas (Frandsen *et al.*, 1991; Kilian & Holmgren, 1981; Reinholdt & Kilian, 1987). Logo após o nascimento, com um mês de vida, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* biovar 1 e *Streptococcus oralis* (Pearce *et al.*, 1995) já puderam ser identificados em crianças saudáveis. Em crianças de 30 dias de vida, *S. mitis* biovar 1 e *S. oralis* foram identificadas na boca e compreenderam 55% dos estreptococos isolados, enquanto que *S. salivarius* constituiu 25,3% de isolados (Pearce *et al.*, 1995). *Streptococcus mitis* compreenderam a maioria dos estreptococos orais detectáveis em crianças de 1 a 5 meses de idade (Smith *et al.*, 1990).

Assim que os dentes começam a erupcionar na cavidade bucal, surgem novos sítios de colonização e a microbiota oral torna-se progressivamente mais complexa. A presença de superfícies dentais não descamativas é suficiente para a colonização por vários estreptococos orais, tais como *Streptococcus gordonii* (Tappuni & Challacombe, 1993) e

Streptococcus sanguinis (Carlsson *et al.*, 1975). Carlsson *et al.* (1975) foram os primeiros a descrever a história natural de colonização por *Streptococcus sanguinis* na cavidade oral, observando que esta espécie não foi detectada antes da emergência dos dentes e que a colonização destes, precedia a de *Streptococcus mutans*. Estes dados foram confirmados em um estudo longitudinal realizado com crianças americanas, em que a colonização inicial por *S. sanguinis* ocorreu durante uma discreta “janela de infectividade”, por volta dos 9 meses de idade, estando relacionada significativamente com a erupção do primeiro dente, que ocorreu em uma idade mediana de 7,1 meses (Caufield *et al.*, 2000). Este estudo mostrou ainda, que os níveis de *S. sanguinis* diminuíram com a idade e que crianças que não albergavam níveis detectáveis de SM tinham níveis de *S. sanguinis* significativamente maiores na saliva, quando comparadas a crianças infectadas por SM. Esta “janela de infectividade” observada para *S. sanguinis* é análoga a uma janela de infectividade posterior, observada por Caufield *et al.* (1993), para aquisição de SM.

Um estudo pioneiro analisando a colonização inicial por SM e sua associação com o desenvolvimento de cárie dentária (Alaluusua & Renkonen, 1983) mostrou que crianças com níveis detectáveis de SM, aos 2 anos de idade, apresentavam uma incidência de cárie, onze vezes superior do que crianças, com mesma idade, não colonizadas por este microrganismo. Posteriormente, Kohler *et al.* (1988) observaram crianças altamente colonizadas por SM, também aos 2 anos de idade, durante a erupção dos primeiros dentes, quando sua microbiota comensal estava se estabelecendo. Os autores mostraram um índice médio de cárie, dez vezes superior em crianças infectadas por SM do que crianças colonizadas mais tardiamente por estes microrganismos.

Estudos longitudinais demonstraram que SM se implantaram mais tardiamente na cavidade bucal de crianças, quando comparados a outras espécies de estreptococos orais (Caufield *et al.*, 1993, Smith *et al.*, 1993, Smith *et al.*, 1998). Smith *et al.* (1993), verificaram que somente 7% das crianças com apenas os incisivos irrompidos (idade média de 9,2 meses) apresentaram níveis detectáveis de SM, enquanto que todas se encontraram colonizadas por *Streptococcus mitis* (biovar 1), 79% por *Streptococcus salivarius* e 50% por *Streptococcus sanguinis*.

A história natural da colonização bucal por SM foi analisada em um estudo prospectivo com 48 crianças, do nascimento aos cinco anos de idade, cujas mães eram altamente colonizadas pelo SM (Caufield *et al.*, 1993). Neste estudo, todas as crianças que adquiriram SM foram colonizadas entre as idades de 19 a 31 meses, sendo que as crianças que não apresentaram níveis detectáveis desta bactéria durante este período definido, não foram colonizadas até o final do estudo, quando estavam com cinco anos de idade. Este período de 19 a 31 de idade foi referido como a “janela da infectividade de SM”, já que após este período, houve uma redução do risco de infecção por este microrganismo. As razões para a delimitação desta “janela de infectividade” ainda não são completamente entendidas, mas podem estar associadas com a erupção dos molares, os quais oferecem uma superfície oclusal retentiva e um habitat livre de microrganismos quando recém irrompidos, fato este que permitiria sua colonização por SM, sem exigir uma prévia competição com outras bactérias indígenas. Estudos posteriores, realizados em crianças americanas, confirmaram esta “janela de infectividade”, em que a aquisição inicial de SM ocorreu entre 13 e 36 meses de idade (com idade média de 28 meses), bem após a erupção inicial dos dentes (Smith *et al.*, 1998).

Por outro lado, a aquisição inicial por SM pode ocorrer antes deste período de janela de infecção (19-31 meses), quando crianças são expostas a um elevado consumo de sacarose e ao contato com a saliva de indivíduos altamente infectados (Berkowitz *et al.*, 1980; Kohler & Adreen, 1994; Mattos-Graner *et al.*, 2001a; Tanner *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004). As mães parecem ser a principal fonte de infecção por SM das crianças, o que foi determinado por análise de fenotipagem e genotipagem de cepas isoladas de pares mãe-filho(a) (Li & Caufield, 1995). Entretanto, outras fontes não maternas, podem estar envolvidas na infecção inicial por SM, como sugerido por alguns estudos realizados em crianças que freqüentam creches (Li & Caufield, 1995, Mattos-Graner *et al.*, 2001a; Klein *et al.*, 2004). Diversos outros fatores comportamentais, intrínsecos ao hospedeiro e ambiental podem influenciar na infecção inicial por SM (Tanzer *et al.*, 2001), como por exemplo, variações nos hábitos dietéticos, de higiene bucal e deficiências imunológicas. Dentre estes, os fatores que influenciam na maturação do sistema imunológico de mucosas precisam ser mais bem investigados (Hajishengallis & Michalek, 1999; Michalek *et al.*, 2002).

A alta exposição à sacarose, embora favoreça a colonização intensa por SM e esteja relacionada ao desenvolvimento de quadros severos de cárie (Van Houte *et al.*, 1982), não parece explicar totalmente a infecção precoce por estes microrganismos. Na população brasileira de crianças atendidas em creches públicas e que possuem uma dieta altamente cariogênica, observou-se uma prevalência de SM em 70,8% entre crianças entre 12 a 19 meses de idade, sendo que 10% das crianças, deste grupo eram altamente colonizadas por estes microrganismos (Mattos-Graner *et al.*, 1998). Os níveis de infecção aumentaram até os 24 meses de idade e após isto, tenderam a se estabilizar (Mattos-Graner

et al., 2001a), o que é compatível com o conceito de fechamento da “janela de infectividade” por volta dos 31 meses de idade proposto por Caufield *et al.* (1993). Portanto, estes dados sugerem que as estratégias para controle de infecção por SM devem ser realizadas antes da maior fase de desafio de infecção por este microrganismo, ou seja, entre os 12 e 18 meses (Mattos-Graner *et al.*, 2001a; Smith *et al.*, 2003a).

2.2. *Streptococcus mutans* (SM) e seus antígenos de virulência.

Streptococcus mutans representam o principal agente etiológico da cárie dental em humanos (Loesche, 1986). A associação do SM com cárie dental foi primeiramente descrita, por Clarke em 1924, em crianças inglesas. Clarke isolou este microrganismo de lesões de cárie e descreveu-os como estreptococos “mutantes”, pois estes apresentavam uma morfologia de cocos mais achatados, semelhantes a bacilos. Durante vários anos, nenhum novo relato foi acrescentado à literatura, mas a partir de 1956, estes microrganismos foram redescobertos como o agente etiológico principal da cárie dental, através de experimentos em animais (Fitzgerald *et al.*, 1960; Fitzgerald & Keyes, 1960; Krasse, 1966). Atualmente a espécie *Streptococcus mutans* é considerada integrante do conjunto de espécies do grupo mutans. Os estreptococos do grupo mutans incluem sete espécies distintas, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* (ambas exclusivas de humanos), *Streptococcus rattus* (isoladas de ratos e de humanos em algumas populações), *Streptococcus cricetus* (isoladas de hamsters), *Streptococcus ferus* (de ratos selvagens), *Streptococcus downei* e *Streptococcus macacae* (em macacos) (Whiley & Beighton, 1998).

Inúmeros estudos epidemiológicos têm investigado o grau de infecção por SM em populações de diversas partes do mundo e sua relação com a prevalência de cárie dental

(Bratthal, 1991). A espécie *Streptococcus mutans* tem sido a mais estudada pela sua mais freqüente relação com o desenvolvimento de cárie, como demonstrado em estudos de detecção destes microrganismos por métodos de cultivo laboratorial (revisado por Li *et al.*, 2003) e por métodos moleculares (Becker *et al.*, 2002). Esta espécie foi a primeira da cavidade bucal a ter o seu genoma seqüenciado (Ajdic *et al.*, 2002). O seqüenciamento do genoma de cepas de outras espécies de estreptococos bucais está em andamento, e incluem outra espécie do grupo mutans (*S. sobrinus*), *S. sanguinis* e *S. gordonii* (Duncan, 2003).

Streptococcus mutans possui uma grande variedade de mecanismos para colonizar a superfície dentária e se tornar uma espécie numericamente significativa no biofilme dental (Bratthall & Kohler, 1976; Burne *et al.*, 1998; Kuramitsu, 2001). Este microrganismo reúne vários fatores de virulência para o desenvolvimento da cárie dental, como a acidogenicidade e aciduricidade; a capacidade de adesão e acúmulo nas superfícies dentárias; a síntese de polissacarídeos intracelulares como forma de armazenamento de substrato e de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis em água (Loesche, 1986; Tanzer, 1992; Hajishengallis & Michalek, 1999). Para colonizar a cavidade oral, SM precisa de superfícies duras, não descamativas, sobre as quais coloniza e se acumula como parte da complexa microbiota do biofilme dentário, denominado de placa dental.

A fase inicial de colonização é dependente da interação específica entre SM e proteínas/glicoproteínas de origem salivar e microbiana adsorvidas às superfícies dentárias (película adquirida do esmalte dental). Esta ligação inicial à película adquirida envolve interações específicas com adesinas microbianas. Diversas adesinas bacterianas foram identificadas em diversas espécies de estreptococos da placa dental (Hasty *et al.*, 1992). Entre elas, está uma família de proteínas denominadas de antígeno I/II (Ag I/II),

primeiramente descrita por Russell & Lehner (1978). O Ag I/II foi identificado em diversas espécies de estreptococos (Bowen *et al.*, 1991), inclusive na espécie SM (Russell & Lehner, 1978). *Streptococcus mutans* não é, entretanto, considerado como bom colonizador primário, pois outros estreptococos não patogênicos, por exemplo, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis*, apresentam adesinas de maior afinidade aos componentes salivares adsorvidos ao dente, o que os conferem uma vantagem competitiva (Smith *et al.*, 1993; Caufield *et al.*, 2000). Além disto, estas espécies comensais produzem IgA1 proteases que promovem a degradação de IgA1 presente na saliva (Hajishengallis *et al.*, 1992).

Outro importante mecanismo de patogenicidade do SM é a desmineralização do esmalte dental, pelo ácido láctico produzido no seu metabolismo fermentativo (Stephan, 1944; Aires *et al.*, 2006). No entanto, para que haja produção de ácido suficiente para sustentar a desmineralização progressiva do esmalte, há necessidade de aumento da proporção de SM no biofilme dentário (Tenuta *et al.*, 2003), a qual é favorecida pela alta tolerância destas espécies a baixo pH (Burne, 1998). *Streptococcus mutans* é capaz de se acumular no biofilme através da síntese e interação com uma matriz de extracelular de glucanos insolúveis (Smith & Taubman, 1990). Este processo de acúmulo é iniciado pela atividade de glucosiltransferases (Gtf) secretadas por SM (Russell *et al.*, 1999; Hajishengallis & Michalek, 1999; Michalek *et al.*, 2001). As Gtfs sintetizam várias formas de glucanos extracelulares de alto peso molecular, a partir da sacarose. Estes polímeros de glucanos, por sua vez, possibilitam a agregação de SM a outros estreptococos orais, aparentemente através da interação com proteínas ligantes de glucanos associadas à superfície celular. Quatro Gbps foram identificadas para a espécie SM, GbpA, GbpB, GbpC

e GbpD (Banas *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1994a, Sato *et al.*, 1997 e Shah & Russell, 2004, respectivamente). Estas proteínas podem ser secretadas ou associadas às superfícies celulares (GbpA, GbpB e GbpD) ou ligadas covalentemente à parede celular (GbpC) e apresentam diferentes afinidades a polissacarídeos, (revisado por Banas & Vickerman, 2003).

A análise funcional das proteínas de virulência é fundamental para compreensão dos mecanismos moleculares de virulência de SM e conseqüentemente para o desenvolvimento de estratégias para controle de infecção por estes microrganismos.

2.2.1. Antígenos I/II (Ag I/II).

Os antígenos I/II correspondem ao grupo de adesinas de superfície expressas pelo *Streptococcus mutans*, e que são também conhecidas como SpaP, Pac ou P1 e, nos *Streptococcus sobrinus*, SpaA. Estudos prévios (Demuth *et al.*, 1988), sugeriram que a ligação inicial do SM à película adquirida seria mediada por esta proteína de superfície celular, de peso molecular aproximado de 185 kDa. Esta adesão ocorreria pela ligação desta adesina às aglutininas ligadas a hidroxiapatita do esmalte (Demuth *et al.* 1988, 1990; Brady *et al.*, 1992). Segundo Brady *et al.* (1992), se estas proteínas salivares estivessem na fase fluída, ocorreria a agregação de bactérias, o que facilitaria a remoção destas bactérias agregadas da cavidade bucal através do fluxo salivar. O Ag I/II é uma proteína de superfície, a qual foi isolada como dois polipeptídeos (antígeno I e antígeno II) de extratos tratados com duas proteases (pronase e tripsina) (Russell *et al.*, 1980). Análises subseqüentes mostraram que o antígeno II (proteína de 69 kDa) era parte integrante do antígeno I, sendo que este último contém o sítio de clivagem pelas proteases.

Esta família de proteínas de superfície liga-se a glicoproteínas salivares e outros microrganismos (Navarre & Schneewind, 1999) e parece participar na virulência e no sucesso de SM em colonizar as superfícies dentárias (Jenkinson & Demuth, 1997). O gene que codifica esta adesina Ag I/II de 185 kDa foi clonado e seqüenciado por dois grupos de pesquisa independentes (Kelly *et al.*, 1989; Okahashi *et al.*, 1989), sendo denominados de *spaP* e *pac*, respectivamente. Estudos moleculares têm mostrado que os genes que codificam Ag I/II são altamente conservados entre os sorotipos de SM. Outras espécies de estreptococos bucais também apresentam proteínas altamente homólogas ao AgI/II de SM (Brady *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1991). Diversas espécies de estreptococos orais apresentam, no entanto, adesinas de maior afinidade a componentes da película adquirida do esmalte do que SM (Frandsen *et al.*, 1991; Liljemark & Bloomquist, 1996). Estas espécies compreendem *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, sendo classificadas como colonizadores primários dos dentes.

O gene *pac* contém 4695 pares de bases (pb) nucleotídicas, codificando uma proteína, a qual contém um peptídeo sinal de 38 aminoácidos e possui duas seqüências internas repetidas, uma rica em alanina e outra em prolina (revisado por Hajishengallis & Michalek, 1999). A representação esquemática das principais regiões da seqüência protéica do Ag I/II encontra-se na Figura 1. O domínio amino-terminal contém a região rica em alanina e provavelmente consiste em um domínio de ligação às glicoproteínas salivares (Crowley *et al.*, 1993; Moisset *et al.*, 1994, Sciotti *et al.*, 1997). Há evidências de que as áreas ricas em prolina fornecem uma aderência adicional às superfícies (Munro *et al.*, 1993). Além disto, regiões mais centrais da seqüência do Ag I/II revelaram ter associação com epítomos de adesão imunodominantes de células B e T (Kelly *et al.*, 1995). A região

carboxi-terminal contém uma parte que reage cruzadamente com IgG humana (Moisset *et al.*, 1994). O Ag I/II de SM apresenta homologia com o SpaA de *S. sobrinus* (Moisset *et al.*, 1994) e outras adesinas desta família em *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. anginosus* (Ma *et al.*, 1991). O Ag I/II tem ainda, uma outra região que é uma seqüência de ancoragem à parede celular bacteriana (Bleiweis *et al.*, 1992).

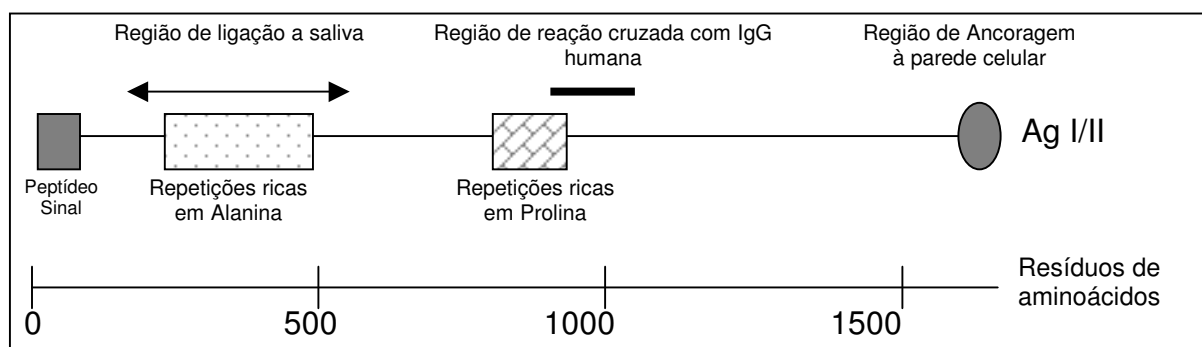


Figura 1 - Representação esquemática das regiões funcionais do Ag I/II. Adaptado de Hajishengallis & Michalek (1999).

Estudos de Love *et al.* (1997) mostraram que Ag I/II de SM liga-se ao colágeno, o que pode favorecer a capacidade deste microrganismo de invadir os túbulos dentinários quando há exposição da dentina. Outro estudo mostrou que o Ag I/II também pode se ligar a outras moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina e queratina (Sciotti *et al.*, 1997). Desta maneira, Ag I/II parece possuir uma versatilidade de tipos de interações sob condições em que a desmineralização dentária leva a exposição de moléculas da matriz protéica dentinária, o que contribui para a progressão das lesões de cárie dentinária e disseminação da bactéria pelo canal radicular (Hajishengallis & Michalek, 1999). A participação do Ag I/II na adesão aos componentes da película

adquirida do esmalte fundamentou o interesse nesta proteína como um potencial candidato à vacina anti-cárie.

2.2.2. Glucosiltransferases (Gtf).

Após aderência inicial de SM à superfície dentária, este microrganismo começa a se acumular sobre os dentes, através de um mecanismo independente, relacionado à síntese de polímeros de glicose extracelulares a partir da sacarose, mediado pelas glucosiltransferases (Gtfs), que são produzidas pelos SM (Kuramitsu, 1993; Michalek *et al.*, 2001). As Gtfs são proteínas de alto peso molecular (140-160 kDa) e SM expressam três Gtfs, GtfB, GtfC e GtfD (Shiroza *et al.*, 1987; Hanada & Kuramitsu, 1988; Hanada e Kuramitsu, 1989), as quais, apresentam 50% de homologia nas suas seqüências de aminoácidos, sendo que GtfB e GtfC apresentam 75% de homologia. As Gtfs possuem cerca de 1500 aminoácidos (1477 e 1456 aminoácidos para GtfB e GtfC, respectivamente), e apresenta dois domínios de maior importância (Figura 2): um domínio catalítico, localizado após a sua extremidade amino-terminal, o qual se liga à sacarose e a hidrolisa (Mooser *et al.*, 1991) e um domínio carboxi-terminal caracterizado por diversas repetições de aminoácidos, que se liga ao glucano recém sintetizado, sendo também necessário para a atividade enzimática de extensão e crescimento das cadeias de glucano (Mooser & Wong, 1988; Kato & Kuramitsu, 1990).

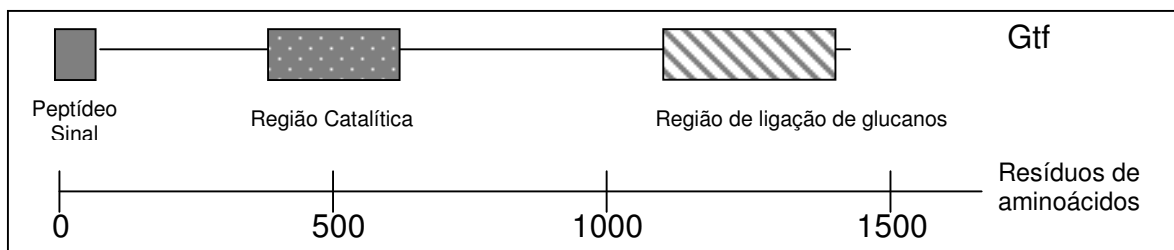


Figura 2 - Representação esquemática das regiões funcionais da Gtf. Adaptado de Hajishengallis & Michalek (1999).

Os isotipos de Gtf, GtfB, GtfC e GtfD, produzem glucanos com graus distintos de solubilidade em água, dependentes do tipo de ligações glicosídicas catalisadas (revisado por Banas & Vickerman, 2005). Tsumori & Kuramitsu (1997) demonstraram, através da construção de mutantes *knockout* de cada gene *gtf*, a importância das glucosiltransferases na aderência *in vitro* de SM, na presença da sacarose. Os resultados deste estudo demonstraram que o mutante *gtfC*, na presença de 1% de sacarose, apresentou somente 1,1% de células aderidas a superfícies lisas *in vitro*, enquanto que a cepa selvagem apresentou 77,9% de células aderidas. A inativação do gene *gtfB*, nos mesmos ensaios, ocasionou uma redução de 4 vezes da aderência, uma vez que sua porcentagem de aderência foi de 18,1%. Em contraste, o mutante *gtfD* praticamente não demonstrou alterações (61,4% de células aderidas) na aderência dependente de sacarose *in vitro* (Tsumori & Kuramitsu, 1997). Desta maneira, os dados deste estudo sugeriram um papel mais significativo do gene *gtfC* no mecanismo de colonização de SM. Por outro lado, estudos em modelos animais com a cepa de SM UA130 indicaram a participação do isotipo GtfD na virulência de SM, sob dieta contendo 56% de sacarose (Yamashita *et al.*, 1993). Estes estudos demonstraram que a síntese extracelular de glucanos insolúveis em água

(ricos em ligações do tipo α -1-3) pelas GtfB e GtfC é mais importante para a cariogenicidade do que os glucanos solúveis (ricos em ligações do tipo α -1-6) produzidos pela GtfD, e que a síntese extracelular de glucanos insolúveis em água, é essencial para a habilidade destas bactérias, de se acumular no biofilme dental e induzir cárie dental (Munro *et al.*, 1991, Yamashita *et al.*, 1993; Tsumori & Kuramitsu, 1997).

2.2.3. Proteínas Ligantes de Glucanos (Gbps).

A interação molecular, das células de SM com a matriz extracelular de glucanos, não é completamente entendida, mas, um grupo heterogêneo formado por proteínas, que se liga a glucano, é denominado de proteínas ligantes de glucanos (Gbp, de *Glucan-binding protein*). *Streptococcus mutans* expressam, pelo menos, 4 Gbps distintas, que são nomeadas de GbpA, GbpB, GbpC e GbpD de acordo com a ordem em que foram primeiramente descritas (revisado por Banas & Vickerman, 2003). A GbpA (Russell *et al.*, 1985), GbpB (Smith *et al.*, 1994a), GbpC (Sato *et al.*, 1997) e GbpD (Shah & Russell, 2004) e seus respectivos genes, *gbpA*, *gbpB*, *gbpC* e *gbpD*, foram clonados e sequenciados (Banas *et al.*, 1990; Mattos-Graner *et al.*, 2001b; Sato *et al.*, 1997, Shah & Russell, 2004, respectivamente) por diferentes grupos. Apesar das afinidades por glucanos, estudos genéticos e bioquímicos indicaram que as Gbps formam um conjunto heterogêneo de proteínas com funções biológicas distintas (revisado por Banas & Vickerman, 2003).

Uma vez que o acúmulo de SM no biofilme dentário, a partir da matriz extracelular de glucanos, parece ser essencial para a patogenicidade de SM, há grande interesse no estudo destas Gbps, as quais poderiam participar da interação das células bacterianas à matriz extracelular de glucanos. Assim, mutantes *knockout* dos genes *gbps*

foram construídos em SM e testados quanto à formação de biofilme e a virulência em modelos experimentais (Hazlett *et al.*, 1998, Banas & Vickerman, 2003; Mattos-Graner *et al.*, 2006).

A GbpA é uma proteína secretada, de peso molecular de 74 kDa (Russell, 1979). Banas *et al.* (1990) seqüenciaram o gene *gbpA* de 1689 pb e verificaram que a seqüência protéica apresentava de 38 a 58% de homologia com o domínio carboxi-terminal das Gtfs. Hazlett *et al.* (1999) mostraram que GbpA contribui para o desenvolvimento da placa formada por SM e que a inativação de *gbpA* modificou a arquitetura do biofilme *in vitro*, embora tenha promovido aumento da virulência da cepa mutante, quando comparada com a cepa selvagem.

A GbpB foi identificada e purificada de fluídos de culturas de SM por cromatografia de troca iônica; apresenta peso molecular aparente de 59 kDa em géis SDS-PAGE e é bioquimicamente e imunologicamente distinta, das outras Gbps, expressa pelo SM e *Streptococcus sobrinus* (Smith *et al.*, 1994a). O gene que codifica esta proteína (*gbpB*) foi clonado e seqüenciado a partir da cepa SJ32 (Mattos-Graner *et al.*, 2001b) de SM, de onde a GbpB foi originalmente purificada. A quantificação de GbpB em sobrenadantes de culturas de mais de 80 isolados de SM, através de imuno-ensaios com anticorpos específicos, revelaram que a GbpB é produzida por todos os genótipos de SM testados (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). A análise dos genes *gbpB* dos isolados clínicos de SM revelaram polimorfismos, principalmente na área central da proteína, sugerindo uma conservação funcional dentro da região amino e carboxi-terminal (Figura 3). Através de engenharia genética, vários estudos têm procurado produzir Ags imunogênicos contendo domínios funcionais conservados da GbpB. Assim, a incorporação de peptídeos de GbpB

com características de interação a moléculas MHC de classe II parece potencializar o efeito da vacinação em modelos animais (Smith *et al*, 2005). A Figura 3 mostra as regiões conservadas da GbpB e também a posição em que estes peptídeos se encontram. A Figura 4 mostra a localização de diversos peptídeos testados quanto a imunogenicidade e capacidade protetora em modelos de cárie experimental (Smith *et a.*, 2003a) na sequência protéica da GbpB.

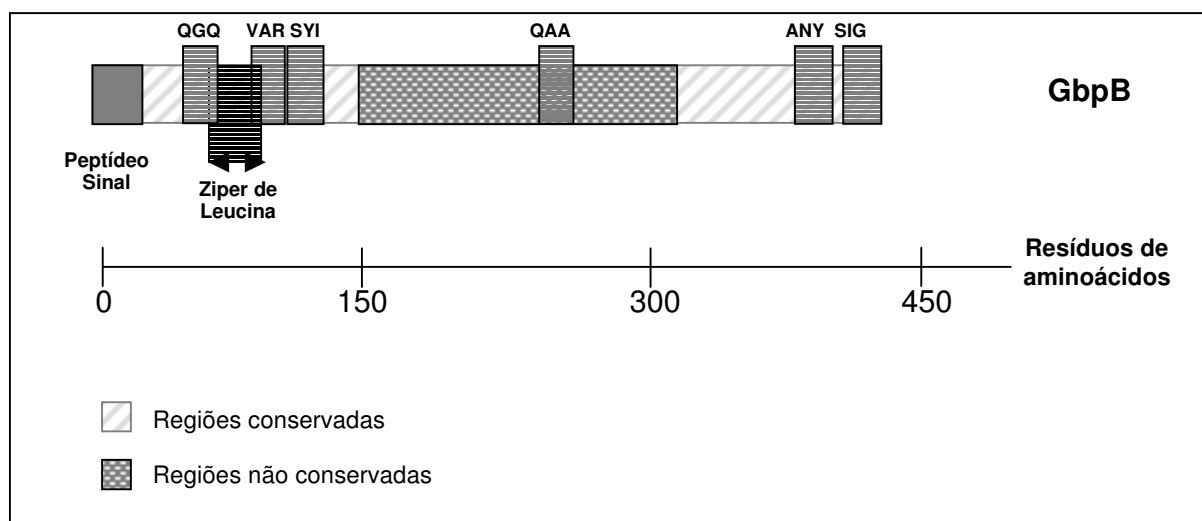


Figura 3 - Representação esquemática das principais regiões da sequência protéica da GbpB e a posição aproximada dos peptídeos sintéticos com possíveis ligações com moléculas MHC classe II. Os peptídeos QGG, VAR, SYI, ANY e SIG localizam-se em áreas conservadas enquanto que o peptídeo QAA em uma região não conservada da proteína GbpB.

```

1  MKKRILSAVL VSGVTLSSAT TLSAVKADDF DAQIASQDSK INNLTAQQA 1AQAQVNTIQG
61  QVSALQTOQA ELQAENQRLE AQSATLGQOI 2QTLSSKIVAR NESLKQQARS AQ3KSNAATSY
121 INAIINSKSV SDAINRVSAI REVVSANEKM LHQQEQDKAA VEQKHQENQA AINTVAANQE
181 TIAQNTNALN TQQAQLEAAQ LNLQAELTTA QDQKATLVAQ KAAAEAAARQ AAAAQAAAEA
241 KAAAEAKALQ E4QAAQQAQAAA NNNNTQATDA SDQQAADN TQAAQTGDST DQSAAQAVNN
301 SDQESTTATA AQPSASSAST AAVAANTSSA NTYPAGQCTW GVKSLAPWVG NYWGNQGQWA
361 ASAAAAGYRV GSTPSAGAVA VWNDGGYGHV 5AYVTGVQGGQ IQVQEANYAG NQ6SIGNYRGW
421 FNPGSVSYIY PN

```

Figura 4 - Sequência de aminoácidos da GbpB contendo seis peptídeos com provável afinidade a moléculas MHC de classe II (marcadas em cinza). As letras maiores e em negrito representam os nomes de cada peptídeo sintetizados laboratorialmente e utilizados no presente estudo.

A GbpB é homóloga a antígenos secretados por diversos patógenos, como *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae* (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). No entanto, não há homólogos de GbpB identificados em espécies comensais da placa dental como *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. oralis*. Há uma alta homologia entre a GbpB e hidrolases de mureína (autolisinas) de outras espécies de microrganismos Gram-positivos. A GbpB apresenta 75% de identidade à proteína designada de PcsB (de *Protein of cell surface from group B streptococci*) (Mattos-Graner *et al.*, 2001b), a qual foi seqüenciada de *Streptococcus agalactiae* por Reinscheid *et al.* (2001). O gene *gbpB* está associado a outros dois genes que codificam proteínas determinantes de forma celular (*mreB* e *mreC*), sendo esta organização gênica conservada em diversas espécies de Gram-positivos (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Estudos subseqüentes indicaram que a GbpB faz parte de uma superfamília de amino-hidrolase/peptidase cisteína, histidina-dependente (superfamília

CHAP), cujos membros hidrolisam substratos contendo resíduos gama-glutamina (Rigden *et al.*, 2003).

O mecanismo de participação de GbpB na virulência de SM ainda precisa ser esclarecido, mas variações na produção desta proteína entre diversos genótipos de SM foram associadas às capacidades de crescimento na forma de biofilmes (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Outros estudos revelaram ainda, que a GbpB é mais expressa sob estresse ácido e osmótico (Chia *et al.*, 2001), embora esta indução pareça ser cepa-específica (Mattos-Graner *et al.*, 2006). Há diversas evidências de que a GbpB é uma proteína essencial de SM, com uma participação no processo de divisão celular. A inativação do gene homólogo a *gbpB* em *S. agalactiae* (*pcsB*) indicou a participação desta proteína na separação do septo de peptidoglicano durante o processo de divisão celular, através da análise morfológica do mutante *pcsB*⁻. Recentemente, a fim de elucidar a função celular da GbpB, Mattos-Graner *et al.* (2006) tentaram inativar o gene *gbpB*, analisar sua expressão e identificar a interação da GbpB com outras proteínas. Apesar das diversas estratégias aplicadas para inativação de *gbpB*, as mutações demonstraram-se instáveis e uma cópia do gene nativo era sempre retida, o que sugere função essencial de GbpB na viabilidade de SM (Mattos-Graner *et al.*, 2006). Cepas mutantes que expressavam proteínas de tamanho atípico, reconhecidas por anticorpos GbpB-específicos, apresentaram interferências severas no crescimento, tamanho aumentado e formação atípica de septos de mureína (Mattos-Graner *et al.*, 2006). Ensaio de co-imunoprecipitação e com proteínas de fusão indicaram que a GbpB interagiu com a proteína ribossômica L7/L12, sugerindo uma função como parte de um complexo protéico envolvido na síntese de peptidoglicanos e na divisão celular (divisoma).

A GbpC é uma proteína de peso molecular de 64 kDa em SDS-PAGE (Hazlett *et al.*, 1998), é covalentemente ligada à parede celular de SM, cuja expressão parece ser mais intensa em condições de estresse osmótico (Sato *et al.*, 1997). A GbpC não apresenta homologia com a GbpA, GbpB ou aos domínios de ligação de glucanos das Gtfs, mas exibe similaridade à família das proteínas de superfície (AgI/II) dos estreptococos. Funcionalmente, este ligante de glucano, está envolvido na agregação dependente de dextranos (Ma *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1997).

A GbpD, foi sequenciada por Shah e Russell (2004), pode funcionar como uma enzima, pois apresenta homologia a enzimas da família das hidrolases alpha/beta (incluindo lipases e carboxilesterases) e demonstra homologia com domínios ligantes de glucanos da GbpA e Gtfs (Shah & Russell, 2004). Mutantes defectivos de *gbpD* demonstram a formação de um biofilme extremamente frágil, em meios de cultura ricos em sacarose, o qual se desprendia facilmente das superfícies de vidro, indicando que a GbpD pode contribuir para a aderência e acúmulo de SM na presença de sacarose (Shah & Russell, 2004).

2.3. Desenvolvimento do sistema imunológico de mucosas durante o estabelecimento da microbiota bucal.

O sistema imune de mucosas é composto por tecidos linfóides associados às superfícies mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital. A principal função deste sistema é o de defesa das superfícies mucosas contra antígenos alimentares, toxinas e invasão de microrganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) (Strober & James, 1994). A primeira linha defesa adaptativa das superfícies mucosas é representada pelas

imunoglobulinas IgA secretora (IgAS), que estão presentes nas secreções, em cooperação com mecanismos inatos protetores, tais como mucinas, aglutininas, outras proteínas de defesa (por exemplo, lactoferrina, lisozima, defensinas) e células (neutrófilos e macrófagos).

Em humanos, os plasmócitos secretores de IgA compreendem 50 a 75% de todas as células secretoras de anticorpos, sendo esta classe de anticorpo, continuamente secretada nos fluídos gastro-intestinais, saliva, lágrimas, urina e outras secreções (Brandtzaeg, 1984). A IgAS da saliva e de outras secreções difere da IgA sérica pela sua estrutura molecular. A IgA presente no soro, se apresenta na forma monomérica clássica, enquanto a IgAS ocorre como um complexo formado por dois monômeros (IgA dimérica) associados por pontes de dissulfeto a uma cadeia polipeptídica J e adicionada de um componente secretor (CS), o qual se origina das células epiteliais glandulares (Killian & Bratthall, 1995; Brandtzaeg, 1995). A secreção desta IgA dimérica é feita por plasmócitos produtores de IgA, localizados na lâmina própria, associada às mucosas e glândulas exócrinas (Brandtzaeg, 1995). Células epiteliais de mucosa sintetizam e expressam uma glicoproteína de superfície que atua como um receptor para imunoglobulinas poliméricas. Dímeros de IgA, no fluído extracelular, ligam-se a estes receptores, sendo endocitados. Os complexos formados são transportados para a região apical das células epiteliais glandulares por transcitose onde, por ação proteolítica, o receptor é clivado, liberando a IgA dimérica para o lúmen da glândula ou mucosa. A parte do receptor que permanece ligada à IgA dimérica secretada consiste no componente secretor (CS) (Crago *et al.*, 1978; Brandtzaeg *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 2002). O CS desempenha uma função importante para a IgAS pois a torna resistente às IgA-proteases produzidas por inúmeros microrganismos.

As funções principais da IgAS consistem na neutralização de componentes virais e bacterianos envolvidos na virulência e bloqueio de receptores importantes para a aderência e invasão dos tecidos. Amostras de saliva total apresentam IgAS, derivadas das glândulas salivares (Marcotte & Lavoie, 1998), mas também IgG, IgM e IgA séricas, as quais atingem a cavidade bucal, principalmente através do fluído crevicular (exsudato plasmático do sulco gengival) (Brandtzaeg, 1989).

Os plasmócitos produtores de IgA descendem de células B estimuladas nos tecidos linfóides associados às mucosas (MALT, de *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*), os quais compreendem os tecidos linfóides da lâmina própria do trato gastro-intestinal (GALT, de *Gut Associated Lymphoid Tissue*), trato respiratório, trato genito-urinário, e tonsilas linguais, palatinas e faríngeas (compondo o anel de Waldeyer) (Roitt & Lehner, 1983). O GALT contém, além dos tecidos linfóides difusos da lâmina própria, agregados nodulares junto à parede intestinal que compõem as Placas de Peyer (Brandtzaeg, 1995). As placas de Peyer são morfologicamente diferentes dos agregados linfóides sistêmicos, pois enquanto os primeiros recebem os antígenos via epitélio, os últimos entram em contato com antígenos através das circulações linfática e sanguínea (Strober & James, 1984). O epitélio da mucosa contém células cúbicas especializadas, denominadas de células M (*membranous cells*). Estas são células epiteliais que capturam o antígeno e o transportam para a região subepitelial das placas de Peyer e de outros agregados linfóides da mucosa. Nestas áreas, o antígeno é processado por macrófagos e células dendríticas, que por sua vez o apresentam a células T e B. Estas células imunocompetentes, quando ativadas, migram para os linfonodos mesentéricos, ducto torácico, circulação sanguínea, e finalmente atingem as lâminas próprias dos vários epitélios da mucosa nos sítios efetores da resposta imune,

principalmente naqueles onde houve indução. Nos sítios efetores, as células B terminam sua diferenciação em plasmócitos (Brandtzaeg, 1995). Todas as etapas de proliferação e diferenciação de células B-IgA+ são altamente dependentes de células T auxiliares e suas linfocinas.

O sistema imune de mucosa do recém nascido saudável é imaturo, mas é rapidamente estimulado pela colonização bacteriana das superfícies mucosas. Haworth & Dilling (1966) estudaram 51 bebês recém nascidos, e verificaram que destes, apenas um apresentou níveis detectáveis de IgA nas secreções logo ao nascimento. Gleeson *et al.* (1982) analisaram amostras salivares de 63 crianças saudáveis, durante o primeiro ano de vida, e confirmaram que IgA era raramente encontrada na saliva ao nascimento. Observaram ainda que menos de 5% das crianças estudadas possuíam níveis detectáveis de IgA nas primeiras semanas de vida, sendo que, no primeiro mês de vida, uma situação reversa foi encontrada, em que somente 3% da população apresentavam níveis não detectáveis de IgA. Os níveis de IgA total nas salivas aumentaram rapidamente nesta população, apresentando um pico de concentração entre 4 a 6 semanas de vida, seguido por um declínio por volta dos 3 meses de idade (Gleeson *et al.*, 1986). Este pico também foi encontrado por Brandtzaeg *et al.* (1988), antes dos dois meses de idade, indicando um rápido processo de maturação do sistema imune de mucosas em humanos. Smith *et al.* (1990) observaram que, por volta dos 9 meses de idade, mais de 95% da IgA presente na saliva encontrava-se na forma de IgAS, embora em níveis bem inferiores aos detectados em adultos (Smith *et al.*, 1990). Outro pico de concentração de IgA em amostras salivares parece ocorrer novamente aos 5 anos, em que níveis de IgA foram significativamente superiores aos níveis de adultos (Gleeson *et al.*, 1991). Aos 7 anos de idade, os níveis

salivares de IgA declinaram novamente e se mantiveram constantes em crianças saudáveis (Burgio *et al.*, 1980; Gleeson *et al.*, 1987), a níveis semelhantes aos encontrados em adultos (Gleeson *et al.*, 1991). Seidel *et al.* (2000) analisaram amostras salivares de 63 recém nascidos saudáveis, para detecção de SIgA, através de ensaios de imunodifusão. Os resultados mostraram que 75 e 77% das crianças com 1 dia e com 2 a 10 dias de vida respectivamente, possuíam níveis detectáveis de IgA, mostrando que altos níveis desta imunoglobulina podem ser encontrados nas salivas de recém nascidos. Estes dados indicam a existência de um sistema imune de mucosa competente logo ao nascimento. Em um outro estudo longitudinal de Wan *et al.* (2003), foram analisados os níveis de imunoglobulinas salivares de 298 crianças, do nascimento até os 18 meses de idade. Dentre estas, 84 crianças eram prematuras. Os resultados mostraram que a maioria das crianças apresentou níveis detectáveis de IgA, IgG e IgM ao nascimento, sendo que a não detecção de IgA nas salivas foi mais freqüente entre crianças prematuras (69%) do que em crianças não prematuras (56%), sugerindo que a prematuridade ao nascimento pode atrasar a detecção de IgA, o que não aconteceu com os níveis de IgG e IgM. Durante o período de acompanhamento deste estudo, houve um aumento progressivo nos níveis de IgA e IgG, o que não aconteceu com os níveis de IgM.

Os níveis totais de IgA em amostras salivares têm sido considerados como um indicador do grau de maturidade do sistema imune de mucosas em crianças (Fitzsimmons *et al.*, 1994, Gleeson *et al.*, 1995; Brandtzaeg *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 1998, Seidel *et al.*, 2000, Wan *et al.*, 2003). Gleeson *et al.* (1991) coletaram amostras salivares de crianças, com idade entre 6 meses e 5 anos, e notaram que elevações dos níveis de IgA foram observadas em 90% das crianças com infecções agudas do trato respiratório. Este aumento

aconteceu cerca de 2 dias após a presença dos sintomas e um pico de resposta, próximo ao quinto dia (variando de 2 a 6 dias). Os níveis de IgA retornavam aos níveis encontrados antes da infecção, após 10 dias do início dos sintomas. Reduções transitórias, dos níveis de IgA detectados na saliva, foram associadas à maior susceptibilidade a infecções do trato respiratório em crianças (Gleeson *et al.*, 1994), reforçando a importância do sistema imune de mucosas na susceptibilidade a infecções.

Em humanos, a IgA está presente em duas subclasses: IgA1 e IgA2. No soro, a IgA1 representa 80 a 90% do total de IgA; nas secreções esta porcentagem é menor, cerca de 60% é IgA1 e o restante IgA2 (Delacroix *et al.*, 1982). A IgA1 e a IgA2 diferem em suas cadeias pesadas em somente 22 aminoácidos. Há a deleção de 13 aminoácidos na cadeia de dobradiça da IgA2 e estes aminoácidos estão presentes na IgA1 (Kerr, 1990). Esta diferença estrutural está relacionada à resistência da IgA2 à ação de inúmeras proteases bacterianas, as quais clivam a região de dobradiça da IgA1 (Kilian *et al.*, 1982; Kerr, 1990; Smith & Taubman, 1992). Anticorpos IgA salivares contra carboidratos e proteínas das bactérias ocorrem predominantemente na subclasse IgA1 e os anticorpos contra ácidos lipoteicóicos e lipopolissacarídeos são mais prevalentes na subclasse IgA2 (Brown & Mestecky, 1985).

Em adultos, as concentrações de IgA na saliva encontradas em diferentes estudos variam bastante (entre 30 g/ml e 410 µg/ml) (Brandtzaeg, 1989; Smith & Taubman, 1992; Wan *et al.*, 2003). Em 1985, Gahnberg *et al.* verificaram que as amostras salivares de crianças com menos de 12 meses de idade, tinham uma média de 30 µg/ml de IgA. Posteriormente, estudos de Camling & Kohler (1987) demonstraram que, em crianças mais

velhas (37 a 72 meses de idade), a concentração salivar de IgA foi de 390 µg/ml e que a concentração desta imunoglobulina em adultos era o dobro da encontrada nas crianças. Smith *et al.* (1987) verificaram que a concentração média de IgA nas amostras salivares de crianças de 2 a 5 meses era de 26 µg/ml. Entre crianças tailandesas da faixa etária, entre 12 e 13 anos de idade, as concentrações de IgA encontradas variaram de 107 a 856 µg/ml (Bratthall *et al.*, 1997). Estudos de Cole *et al.* (1999) mostraram que a concentração de IgA1 em salivas de crianças com 2 anos de idade foi em média 64,7µg/ml. Mais recentemente, níveis inferiores, entre 0 a 50µg/ml de IgA (média: 22,4µg/ml $\pm$ 7,3) foram detectados nas salivas de crianças de 6 a 18 meses de idade, os quais aumentaram com a idade (Wan *et al.*, 2003).

A imunoglobulina M (IgM) é a segunda maior classe de imunoglobulina secretora no homem. Esta imunoglobulina é raramente encontrada nas salivas de crianças (Gleeson *et al.*, 1986, Thrane *et al.*, 1987) e de adultos (Gleeson *et al.*, 1990; Smith & Taubman, 1992). A IgM está ausente na saliva ao nascimento e encontra-se em níveis detectáveis em 15 a 23% dos bebês de 1 a 6 meses de idade (Gleeson *et al.*, 1986). Smith *et al.* (1989), demonstraram que os níveis de IgM em amostras salivares de crianças diminuíram durante os primeiros 3 a 4 meses de vida, enquanto que os níveis de IgA aumentaram. Deficiências, na produção de IgA, pareceram ser compensadas, pela produção e secreção de IgM em crianças de maior idade e adultos (Fernandes *et al.*, 1995; Gleeson *et al.*, 1995). Entretanto, este mecanismo compensatório não foi observado em crianças durante os primeiros dois anos de vida (Gleeson *et al.*, 1995). Isotipos IgM são detectados

na saliva de crianças jovens associados ou não a componentes secretores (Smith & Taubman, 1992).

Pouco se sabe sobre a relação entre IgM e IgA na faixa etária estudada, de 5 a 13 meses de idade, o que pode ser um dado importante para o entendimento da ontogenia do sistema imune de mucosas. Pouca informação, há ainda, sobre as proporções das classes de IgA (IgA1 e IgA2) nesta idade estudada (Childers *et al.*, 2003). As proporções destes isotipos podem também refletir o grau de maturação da resposta imune adaptativa de mucosas, visto que o isotipo IgA1 diminui com o aumento da idade, atingindo pequena proporção nas secreções de adultos, onde a maior parte de IgA é da classe IgA2 (Smith & Taubman, 1992).

A exposição antigênica pode influenciar na ontogenia da resposta imune secretora (Mellander *et al.*, 1985; Nagao *et al.*, 1993), sendo que a capacidade do sistema imune de responder a desafios infecciosos, durante o estabelecimento da microbiota indígena, pode ser um importante componente de defesa do hospedeiro. A IgAS desempenha uma função importante na proteção contra infecções causadas por enteropatógenos e vírus em homens e modelos animais (Frandsen *et al.*, 1987; Michetti *et al.*, 1992). Mellander *et al.* (1986) detectaram anticorpos IgA contra antígeno O de *Escherichia coli* e poliovírus em amostras salivares de crianças recém nascidas, mesmo antes da detecção da colonização por estes microrganismos.

Maiores riscos de infecção por patógenos da mucosa respiratória (por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*), observados antes dos 2 anos de idade, têm sido associados à baixa resposta de IgAS a antígenos específicos destes patógenos (Yamanaka & Faden, 1993; Faden *et al.*, 1994; Faden *et al.*,

1995). Associação entre a especificidade de anticorpos IgA e a aquisição inicial de patógenos bacterianos sugere que o sistema imune de mucosas é capaz de modular o estabelecimento de patógenos nas mucosas nasofaríngeas. Por exemplo, um pico na resposta a um Ag potencialmente aplicado em vacinas contra *Haemophilus influenzae*, a proteína de membrana externa (OMP) P6, foi detectada em idade precoce (1 a 24 meses) entre crianças que apresentavam curta persistência de colonização por *H. influenzae*. Por outro lado, a fraca resposta a este Ag foi observada em crianças colonizadas por maior diversidade de cepas desta bactéria durante períodos mais longos (Yamanaka & Faden, 1993; Faden *et al.*, 1994; Faden *et al.*, 1995). A persistência de colonização recorrente por cepas de *H. influenzae* em crianças susceptíveis à otite foi também associada à fraca resposta imune local ao antígeno OMP P6 na faixa etária de 10 a 25 meses (Yamanaka e Faden, 1993).

A indução da resposta de IgAS na saliva contra *Streptococcus mutans* poderia ser uma estratégia auxiliar no controle da cárie dentária. Poucos estudos investigaram o padrão de resposta imune a SM em crianças de baixa faixa etária, durante a aquisição inicial destes microrganismos (Camling & Köhler, 1987, Smith *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1999), considerada como a fase ideal para programas de controle de infecção por SM (Russell *et al.*, 1999). Os estudos nesta área foram realizados em populações com baixos índices de cárie e baixa frequência de infecção por SM e sugeriram que as crianças somente desenvolvem um padrão mais complexo de resposta imune adaptativa a antígenos de SM (definido pela diversidade de antígenos reconhecidos por IgA salivar), a partir dos 2 anos de idade, quando os níveis destas bactérias foram detectáveis na cavidade bucal (Smith *et al.*, 1998, Cole *et al.*, 1999). Esta baixa complexidade de resposta a SM durante o primeiro

ano de vida, não foi decorrente de deficiências na maturação do sistema imunológico das crianças estudadas, uma vez que os padrões de IgA específica a Ags de *Streptococcus mitis* biovar 1, um colonizador primário da cavidade bucal, revelaram um grande número de Ags de *S. mitis* reconhecidos por IgA nas amostras salivares (Smith *et al.*, 1998). Embora estudos sugiram que a redução do risco de colonização bucal por SM após os 2,5 anos de idade ocorra devido ao estabelecimento de uma microbiota comensal competitiva nas superfícies dentárias recém-irrompidas (Caufield *et al.*, 1993; Caufield *et al.*, 2000), pouco se sabe sobre o papel da maturação do sistema imune de mucosas no estabelecimento de SM na cavidade bucal.

2.4. Antígenos de virulência de SM: imunogenicidade e efeito protetor contra a cárie dentária.

Os primeiros estudos indicando que a indução da produção de IgAS contra Ags de SM poderiam conferir proteção contra a cárie dental foram realizados na década de 70 (Michalek *et al.*, 1976, Taubman & Smith, 1977; Lehner *et al.*, 1978). Os avanços no entendimento dos mecanismos moleculares de patogenicidade de SM têm favorecido o desenvolvimento de diversas estratégias para o controle da infecção por estes microrganismos (revisado por Hajishengalis & Michalek, 1999; Smith *et al.*, 2002, Michalek, *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2004). Diversos estudos em modelos animais, demonstraram que a indução de anticorpos contra Ags de superfície de SM envolvidos na virulência (AgI/II, Gtfs e GbpB) foi capaz de conferir proteção contra a cárie dentária, sob alta exposição à sacarose (cerca de 55% de sacarose na dieta) (Bowen *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1997; Jespersgaard *et al.*, 1999). Smith *et al.* (1990) observaram que salivas de crianças

americanas freqüentemente continham IgA reativo para a GbpB, indicando que a infecção inicial por SM poderia levar a uma resposta imune natural a esta proteína (Smith *et al.*, 1990). Posteriormente, a análise da resposta imune natural a SM, em 33 crianças com idade entre 13 e 36 meses, revelou que a maioria dos anticorpos salivares IgA era específica a Ags de SM importantes na sua colonização e acúmulo, incluindo-se o AgI/II e Gtfs (Smith *et al.*, 1998). Em algumas crianças, os anticorpos específicos a Ags de SM puderam ser detectados antes mesmo da detecção deste microrganismo na cavidade bucal (Smith *et al.*, 1998).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que anticorpos específicos para Ag I/II do SM ou SpaA do *S. sobrinus* puderam interferir na adesão/colonização bacteriana e no desenvolvimento da cárie dental. Lehner *et al.* (1981) analisaram os efeitos imunogênicos e protetores contra a cárie dental da imunização com AgI/II, em 40 macacos que recebiam uma dieta cariogênica (15% de sacarose na dieta). Os resultados mostraram que houve uma significativa redução nos índices de cárie dental dos macacos imunizados, quando comparados àqueles não imunizados. A imunização passiva local, com anticorpos monoclonais Ag I/II-específicos em humanos, demonstrou reduções nos níveis de infecção bucal por SM em adultos, quando comparados com indivíduos não imunizados (Ma *et al.* 1987; Ma *et al.*, 1998). Takahashi *et al.* (1991) sintetizaram quatro peptídeos com base na sequência de aminoácidos do PAc (ou Ag I/II), entre estes peptídeos, PAc (resíduo 301-319) que correspondia às regiões ricas em alanina. A imunização de camundongos, com este peptídeo, mostrou uma diminuição na colonização por SM nas superfícies dentárias destes animais. Hajishengallis *et al.* (1992) investigaram o efeito da IgAS humanos específicos a Ag I/II sobre a aderência de SM; os autores constataram que estes anticorpos

puderam interferir na adesão inicial de SM à película de saliva que recobre os dentes. Posteriormente, estudos em ratos, infectados oralmente com SM e submetidos à imunização intranasal com AgI/II, apresentaram níveis de SM significativamente menores na placa dental e menores índices de cárie do que ratos infectados e não imunizados (Katz *et al.*, 1993). Entretanto, o mecanismo protetor de imunização com AgI/II não é conhecido e há evidências de que a inativação do gene *pac* (que codifica AgI/II) não produz redução na virulência de cepa de SM em modelo de animais (Koga *et al.*, 1990).

As glucosiltransferases são os antígenos mais bem caracterizados em SM (revisado por Russell *et al.*, 1999; Hajishengallis & Michalek, 1999; Michalek *et al.*, 2001; Koga *et al.*, 2002; Michalek *et al.*, 2002). Smith *et al.* (1979) analisaram a administração oral de glucosiltransferases em hamsters, verificando a produção de anticorpos salivares e séricos, específicos a estes antígenos. Os hamsters imunizados apresentaram um acúmulo significativamente menor de SM e uma média 4 vezes menor de lesões de cárie, do que os animais do grupo controle. A imunização via oral de hamsters, durante 21 dias, com um complexo de Ags de Gtf foi capaz de induzir a produção de anticorpos salivares (IgA e IgC) e séricos (IgG e IgM) e os níveis destes anticorpos foram dependentes da dose de antígeno utilizado (Smith *et al.*, 1980). A presença de anticorpos salivares (IgA) e séricos (IgG) Gtf-específicos inibiram a implantação de SM na boca (Smith *et al.*, 1982) em hamsters, após a inoculação de SM (1×10^7 ufc) durante 4 semanas, sob administração de dieta contendo 56% de sacarose. O efeito da imunização com Gtf de *Streptococcus sobrinus* sobre os níveis bucais de SM foram testados em humanos adultos. Cápsulas de Gtf combinadas com fosfato de alumínio foram administradas oralmente por duas vezes, e intervalo de 3 meses. Quatorze homens adultos formaram o grupo imunizado e onze

homens, o grupo placebo. Estes indivíduos possuíam níveis de SM similares e foram submetidos à profilaxia dental imediatamente antes de cada imunização e os níveis de anticorpos e de bactérias analisados. Após a primeira imunização, as amostras salivares do grupo imunizado apresentaram níveis superiores de IgA do que nos pacientes do grupo placebo. Entre a primeira e a segunda imunização, os níveis de IgA específicos a Gtf foram maiores no grupo imunizado e os níveis de SM foram sempre menores nas amostras do grupo vacinado (Smith *et al.*, 1987). Assim, a indução de anticorpos contra Gtf apresenta efeito redutor dos níveis de infecção, mesmo em indivíduos previamente colonizados por esta espécie.

Aplicação tópica de Gtf de *S. sobrinus* foi administrada sobre a mucosa do lábio inferior de adultos (entre 18 e 42 anos de idade), a fim de verificar a eficiência desta via de administração antigênica e seu efeito no re-acúmulo de SM nos dentes após profilaxia dental. Estes pacientes foram divididos em dois grupos: imunizado e placebo. Os indivíduos selecionados tinham níveis similares de infecção por SM e anticorpos IgA anti-Gtf. Os grupos foram então submetidos à profilaxia dental imediatamente antes da aplicação tópica do Ag de Gtf ou placebo. A aplicação tópica da Gtf promoveu um aumento significativo de IgA anti-Gtf no grupo imunizado em relação ao grupo placebo, e as proporções de SM foram sempre significativamente menores no grupo imunizado, do que no placebo (Smith & Taubman, 1990).

A imunização passiva também demonstrou o efeito protetor de anticorpos anti-Gtf no desenvolvimento da cárie dentária. Hamada *et al.* (1991) analisaram *in vitro* e *in vivo* o efeito da administração de anticorpos policlonais, proveniente de ovo de galinha, formados contra células inteiras de SM, Gtf secretada (livre de células de SM) ou Gtf

associada a células de SM. A análise *in vitro* revelou que os anticorpos IgY anti-células de SM e IgY anti-Gtf associada a células inibiam a aderência das células de SM à superfície de vidro em 97 e 92% respectivamente. A análise *in vivo*, da imunização passiva (administração oral) em ratos com anticorpos IgY contra Gtf associada com células inteiras, apresentou o melhor resultado, pois promoveu uma redução significativa do acúmulo de placa dental (redução de 46,4% em relação aos ratos não imunizados).

Embora várias proteínas ligantes de glucano (Gbps) tenham sido descritas (revisado por Banas e Vickerman, 2002), somente a GbpB de SM (Smith *et al.*, 1994a) pareceu apresentar propriedades imunogênicas e protetoras contra a cárie dental. Diversas características desta proteína ressaltam seu potencial como um alvo no desenvolvimento de vacinas. A GbpB é produzida por todas as cepas laboratoriais ou clínicas testadas até o momento (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Mais de 80 isolados clínicos de SM testados em imuno-ensaios com anticorpos GbpB-específicos apresentaram níveis detectáveis de GbpB em fluídos de cultura e em extratos celulares (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Smith *et al.* (1994a) mostraram que 20 das 24 salivas de adultos testadas, em ensaios ELISA, continham IgA reativo contra a GbpB. Neste mesmo estudo, em ensaios western blot com salivas humanas, GbpA mostrou pouca ou nenhuma reação com anticorpos IgA. Estes resultados sugeriram que a GbpB é mais imunogênica em humanos do que a GbpA.

Smith *et al.* (1996) avaliaram a habilidade de induzir a produção de anticorpos IgA através da imunização com GbpB ou Gtf de SM em ratos. Para isto, estes ratos receberam injeções subcutâneas de GbpB ou Gtf e, depois de detectado a presença de anticorpos (salivares ou séricos) IgA anti-GbpB ou anti-Gtf, estes ratos foram infectados oralmente com SM e receberam dieta contendo 56% de sacarose durante 71 dias. Os níveis

de SM nos molares dos ratos, após terem sido imunizados com GbpB ou Gtf, foram menores (redução de 72,7 e 47,9% respectivamente para GbpB e Gtf) do que dos ratos não imunizados. O número de lesões cariosas nas superfícies dos molares foi aproximadamente 2 vezes menor nos animais imunizados, quando comparados com os ratos não imunizados.

Tyler & Cole (1999) analisaram o efeito da imunização com Ags de SM em quatro chipanzés fêmeas, durante a gestação, nas concentrações de IgAS no leite materno. Os dados deste estudo mostraram que três destes animais apresentavam IgA1S específico para a GbpB (proteína de 59 kDa), dois apresentaram SIgA1 contra Gtf e nenhum apresentou anticorpos para GbpA (74 kDa) e todos tinham anticorpos específicos para Ag I/II.

Smith *et al.* (2001a) estudaram a influência da administração passiva de anticorpos IgY (proveniente do ovo de galinhas imunizadas com GbpB) anti-GbpB em ratos infectados com SM. Houve uma diminuição significativa nos níveis de SM nos molares e também nos índices de cárie dental nos animais imunizados, os quais foram 50% menores, quando comparados aos animais não imunizados. Assim, a administração oral de IgY anti-GbpB pôde interferir na colonização por SM, sob condições de alta exposição à sacarose e conseqüentemente, interferir no desenvolvimento da cárie dental.

2.5. Identificação de epítomos imunogênicos e com atividade protetora contra a cárie dental.

A identificação de epítomos com atividades protetoras, pode auxiliar na identificação de domínios funcionais e no desenvolvimento de vacinas de subunidades. Peptídeos específicos de um ou mais Ags de virulência podem ser associados, para induzir

uma resposta imune multiepitópica que interfira em diversos processos de colonização e infecção.

Smith *et al.* (1996) descreveram que as imunizações com GbpB e Gtf conferiram uma redução no desenvolvimento de cárie experimental e que a proteção, decorrente da administração destes dois antígenos, resultaram na indução da resposta imune a diferentes epítomos independentes, visto que não houve uma reação cruzada entre anticorpos do soro (IgG) e IgA salivar para GbpB e Gtf de SM. Dessa forma, a combinação de epítomos destes dois Ags poderia potencializar o efeito das imunizações sobre a infecção e colonização pelo SM.

Através de estudos de mutagênese sítio-dirigida e de diversos estudos genéticos e bioquímicos, identificou-se que a região amino-terminal das Gtfs, que compreende cerca de 800 resíduos, parece ser essencial para a atividade catalítica destas enzimas (Tsumori *et al.*, 1997; Monchois *et al.*, 2000). Notou-se, também, que as seqüências repetidas, ricas em tirosina, da extremidade carboxi-terminal das Gtfs, estavam associadas com sua capacidade de ligação a glucanos, sendo também necessárias para sua atividade catalítica (Abo *et al.*, 1991, Lis *et al.*, 1995). Smith *et al.* (1993) testaram a antigenicidade de um peptídeo sintético derivado de domínios carboxi-terminal de ligação a glucanos das Gtfs de SM em ratos e humanos. A imunização subcutânea com este peptídeo, denominado de GLU (1303-TGAQTIKGQKLYFKANGQQVKG-1324), induziu altos níveis de produção de IgG sérica específica.

Smith *et al.* (1994b) analisaram a imunogenicidade de outro peptídeo sintético da região conservada do domínio catalítico de Gtfs de SM e de *S. sobrinus*, o peptídeo CAT (442-DANFDSIRVDAVDNDVDADALLQI-464), derivado da porção amino-terminal das

Gtfs. Primeiramente, este peptídeo foi injetado subcutaneamente em ratos, para obtenção de anticorpos policlonais, e intraperitonealmente em camundongos para posterior produção de anticorpos monoclonais. Ensaio ELISA mostraram que tanto os anticorpos obtidos de ratos quanto os de camundongos reagiram com CAT, Gtf de SM e Gtf de *S. sobrinus*. Os anticorpos monoclonais inibiram a síntese de glucanos insolúveis pelas Gtfs de SM e *S. sobrinus*. Desta maneira, o peptídeo CAT contém epítomos de células B, assim como as Gtfs intactas de SM. Smith *et al.* (1994b) testaram ainda, a imunização sistêmica de ratos com peptídeos CAT e GLU, derivados das Gtfs, e notaram que a imunização promoveu uma redução significativa no número de lesões de cárie nos animais infectados artificialmente com SM ou *S. sobrinus*, sob uma dieta rica em sacarose.

Em 1997, Smith *et al.* analisaram a imunogenicidade e indução de proteção de dois novos peptídeos derivados dos domínios catalíticos das Gtfs, GGY (GGYEFLLANDVDNSNPVVQ) e AND (ANDVDNSNPVVQAEQLMWL), os quais foram sintetizados a partir de regiões altamente conservadas entre as espécies SM e *S. sobrinus*. Imunoglobulinas G anti-GGY ou anti-AND reagiram com Gtf de SM e CAT e também inibiram a atividade catalítica de Gtfs purificadas de *S. sobrinus* e SM. Os níveis medianos de infecção por SM em ratos imunizados com estes dois peptídeos foram 50% inferiores aos os níveis de infecção dos animais não imunizados.

Jespersgaard *et al.* (1999) clonaram e caracterizaram os domínios catalíticos (CAT) e ligantes de glucano (GLU) derivados de GtfB de SM; obtiveram anticorpos contra estes dois peptídeos, através da imunização de coelhos, e notaram que anticorpos anti-CAT inibiram significativamente a síntese de glucanos insolúveis pela Gtfs de SM, e que anticorpos anti-GLU inibiram significativamente a síntese de glucanos insolúveis e solúveis

pela GTF de SM, demonstrando que estes anticorpos provenientes de peptídeos sintéticos podem inibir uma variedade de Gtfs. Neste estudo, demonstraram ainda, que a imunização intranasal com estes peptídeos em camundongos conferiu um aumento significativo nos níveis de IgA no soro, saliva e outras secreções, quando comparado com animais não imunizados.

Childers *et al.* (1999) investigaram os efeitos imunogênicos em humanos da Gtf purificada ou incorporada a lipossomos. Os resultados mostraram que não houve diferenças nas respostas imunes às vacinas de Gtf ou incorporada a lipossomos, mas os níveis de IgA1 anti-Gtf em lavagens nasais de ambos os grupos aumentaram em cinco vezes, quando comparados com os fluídos coletados dos mesmos indivíduos antes da imunização.

Taubman *et al.* (2001) analisaram o efeito da imunização de ratos com a Gtf e com dois peptídeos derivados da Gtf associados ou não entre si. Para isto, analisaram os níveis de IgG e IgA contra a Gtf após as imunizações. Os peptídeos utilizados foram o CAT e o peptídeo GLU. Estes peptídeos CAT e GLU foram sintetizados como complexos de múltiplos peptídeos antigênicos (MAPs de *Multiple Antigenic Peptides*), sendo ligados a uma matriz de lisina, como descrito por Tam (1988). Os níveis de IgG e IgA salivares contra Gtf, no grupo que recebeu os peptídeos associados (CAT e GLU) foram superiores (5 a 10 vezes maiores) do que nos grupos que receberam individualmente os peptídeos CAT ou GLU. Ratos imunizados com Gtf, com os peptídeos individuais ou associados apresentaram reduções significativas no número de lesões de cárie, quando comparados com ratos não imunizados.

As imunizações intranasal de ratos com os peptídeos derivados da Gtf, HDS (VPSYSFIRAHDSEVQDLIA) ou este em complexo com GLU (HDS-GLU), foram

testados por Smith *et al.* (2001). Vários métodos de facilitação de resposta imune foram utilizados neste estudo, a fim de induzir uma resposta imune anti-peptídica mais eficiente após a imunização intranasal. Estes métodos incluíram a incorporação dos peptídeos sintéticos a micropartículas bioadesivas (Smith *et al.*, 2000), o uso de monoepítipo de HDS ou diepítipo (HDS-GLU) ou ainda, o uso de adjuvantes de mucosas, dentre eles: o toxóide da cólera (TC) ou a um enterotoxóide derivado da *E. coli* (LT R192G) (Dickinson & Clements, 1995). Nenhuma resposta de IgA foi detectada após imunização com HDS-GLU com as micropartículas. No entanto, uma significativa resposta de IgA e IgG ao HDS associado a micropartículas foi induzida em todos os ratos, quando estes receberam este peptídeo juntamente com o enterotoxóide (LT R192G) ou toxóide da cólera (TC). Desta maneira, este peptídeo HDS, administrado intranasalmente, pôde induzir uma resposta imune de IgA e IgG, quando associados a veículos que facilitaram a resposta imune de mucosa.

Smith *et al.* (2003b) analisaram se a imunização retal com Gtf de SM poderia induzir a formação de anticorpos salivares contra este antígeno e sua relação com cárie dental. Ratos foram imunizados via intranasal e retal com Gtf associadas à micropartículas à imunização, os ratos foram infectados com *S. sobrinus* durante 79 dias. Todas as formas de imunização foram efetivas na produção de anticorpos IgA e IgG anti-Gtf e o número médio de lesões de cárie em ratos imunizados via retal (média: $7,9 \pm 1,0$) ou intranasal (média: $7,1 \pm 0,9$) foram menores, quando comparados com os índices de cárie dos ratos não imunizados (média: $11,9 \pm 1,6$).

A imunogenicidade da GbpB é baseada, em parte, na apresentação de peptídeos da GbpB processados sobre a superfície de células apresentadoras de antígenos em

complexo com moléculas do MHC de classe II para os linfócitos T envolvidos na ativação de células B (Smith *et al.*, 2003a). Através da análise de bioinformática, foram identificados diversos peptídeos de alta afinidade a diversos alelos MHC de classe II (Smith *et al.*, 2003a).

Estudos de Smith *et al.* (2003a) identificaram possíveis regiões imunogênicas dentro da sequência da GbpB, para o uso de uma vacina de subunidades. Com auxílio de bioinformática (EpiMatrix) estimaram-se os ligantes característicos de peptídeos derivados da sequência da GbpB, com o auxílio de um programa que reconhece alelos ligantes do MHC II. A análise da sequência da GbpB revelou vários peptídeos com alta probabilidade de ligação a MHC II. Dois peptídeos amino-terminais (denominados SYI e QGQ, Figura 3) foram sintetizados como MAPs, contendo quatro cópias das respectivas seqüências. Ratos foram imunizados subcutaneamente com estes dois peptídeos separadamente e posteriormente infectados com SM. Os ratos imunizados com SYI ou QGQ tiveram titulações significantes de anticorpos IgA e IgG específicos a eles, que também reagiram com GbpB. Somente uma minoria de ratos imunizados com GbpB nativa demonstrou níveis significativos de IgG reativa a estes peptídeos. A resposta imune induzida em ratos imunizados com SYI ou GbpB foi suficiente para diminuir em aproximadamente 50 e 65% respectivamente, as lesões de cárie provocadas pela infecção pelo SM.

Peacock *et al.* (2005) mostraram a influência da associação de micropartículas bioadesivas na imunogenicidade do peptídeo SYI. O peptídeo SYI com micropartículas foi efetivo na produção de IgA anti-SYI e anti-GbpB das secreções nasais e salivares de ratos. Recentemente, Smith *et al.* (2005) analisaram os efeitos da imunização de ratos com dois peptídeos construídos, um derivado da GbpB e outro da Gtf. Um deles, SYI (derivado da

GbpB), incluía uma seqüência com características ligantes de MHC II e outros dois, CAT e GLU, continham seqüências de domínios catalíticos e domínios de ligantes de glucano das Gtfs. Estes peptídeos foram associados (SYI-CAT) ou não. Somente SYI-CAT induziu níveis significativos de IgG no soro e IgA na saliva específicos para a GbpB. Todos os ratos imunizados com peptídeos isolados ou associados tiveram menores índices de cárie do que o grupo controle.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o potencial do sistema imunológico humoral de mucosas, durante o período de colonização inicial por SM em crianças de 5 a 13 meses de idade, em estudo prospectivo de 18 meses de duração. Para isto, os objetivos específicos do presente estudo foram:

- a) determinar os níveis salivares de anticorpos IgA, IgA1 e IgM em 119 crianças com idade inicial de 5 a 13 meses e após 6, 12 e 18 meses de acompanhamento;
- b) comparar os padrões de antígenos de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus mitis* reconhecidos por anticorpos IgA salivares entre subgrupos de crianças colonizadas precocemente por SM e não colonizadas por estes microrganismos nas diferentes fases do estudo;
- c) identificar peptídeos derivados da GbpB, reconhecidos por anticorpos IgA salivares nas crianças estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em duas partes. A parte I envolveu as análises dos níveis e especificidade de anticorpos IgA na saliva, durante o estudo longitudinal de 18 meses, iniciado em uma amostra de 160 crianças entre 5 e 13 meses de idade. A parte II envolveu as análises dos padrões de peptídeos de GbpB reconhecidos por anticorpos IgA das salivas coletadas de um subgrupo da amostra inicial.

4.1. PARTE I

Os resultados parciais desta parte foram incluídos no trabalho científico *“Characterization of salivary IgA responses in children heavily exposed to the oral bacteria Streptococcus mutans: influence of specific antigen recognition in infection”* (Anexo 1).

4.1.1. Amostra estudada e delineamento do estudo prospectivo

Foram envolvidas neste estudo, todas as crianças com idade inicial entre 5 a 13 meses, de um total de 28 berçários das Escolas Municipais de Ensino Infantil (EMEI) da cidade de Piracicaba (SP). Assim, uma amostra de 160 crianças (95 meninos e 75 meninas) foi incluída no estudo. Após 6, 12 e 18 meses de acompanhamento, 141, 131 e 119 crianças mantiveram-se no estudo respectivamente. Este estudo prospectivo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FOP-UNICAMP (protocolo n°. 110/2002) (Anexo 2). Assim, somente foram incluídas no estudo, aquelas crianças cujas mães assinaram o termo de consentimento, previamente aprovado pelo CEP, FOP-

UNICAMP, após compreensão dos objetivos e forma de condução do estudo (Anexo 3). As agentes de saúde e mães das crianças com lesões de cárie diagnosticadas durante o estudo receberam instrução e auxílio-transporte (passes de ônibus urbanos), para recebimento de tratamento no Centro de Atendimento de Pacientes Especiais (CEPAE) da FOP-UNICAMP, como previsto pelo CEP e CEPAE, no início do estudo.

As crianças desta amostra são atendidas nas EMEIs durante cinco dias por semana, durante período de dez horas diárias, quando recebem quatro refeições ricas em sacarose. Esta população consome água fluoretada (aproximadamente 0,7 ppm) e a higiene bucal, a qual inclui escovação dentária, é somente iniciada quando as crianças completam dois anos de idade. As crianças recebem medicamentos, quando solicitado pelos responsáveis.

O estudo prospectivo de 18 meses consistiu de exames clínicos e laboratoriais realizados em intervalos de 6 meses. Entrevistas também foram realizadas com as mães. A Figura 5 ilustra o delineamento do estudo prospectivo e os procedimentos realizados em cada fase. Quarenta e uma crianças não permaneceram no estudo até a fase T18. Isto porque, algumas delas, haviam saído ou não estavam presentes nos dias das visitas às EMEIs. A evasão anual de 18,1% foi inferior à evasão esperada de 30% ao ano.

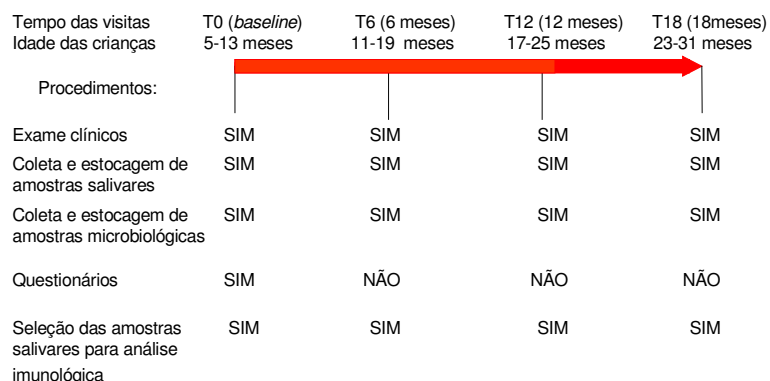


Figura 5 - Delineamento do estudo prospectivo iniciado com uma amostra de 160 crianças na faixa etária de 5 a 13 meses, as quais freqüentam 28 EMEIs da cidade de Piracicaba, SP. Estas crianças foram acompanhadas durante 18 meses, até apresentarem uma idade entre 23 e 31 meses. No início do estudo (T0) e a cada intervalo de 6 meses, as crianças foram examinadas. Questionários para análise de fatores comportamentais e sócio-econômicos foram respondidos pelas mães das crianças no início do estudo. A cada exame, amostras bucais e salivares foram coletadas, para a análise da colonização bucal por SM e para estudo dos níveis/padrões de produção de anticorpos IgA, IgA1 e IgM. Amostras bacterianas foram isoladas para análise genotípica. Um subgrupo de 21 crianças colonizadas precocemente por SM (fases T0 e T6) foi pareado a um grupo semelhante de crianças não colonizadas (com base em variáveis obtidas nos exames e entrevistas), sendo que, ao final do estudo, 8 pares sustentaram as condições de infecção ou não por SM. Estes subgrupos foram formados para análise dos níveis de IgA e padrões de resposta específica a antígenos de SM e *S. mitis*.

4.1.2. Questionários.

No início do estudo, as mães de 120, das 160 crianças envolvidas, foram entrevistadas pelas agentes de saúde de cada EMEI, com base em um questionário padrão (Anexo 4), o qual compreende questões sobre hábitos dietéticos, de higiene bucal e geral da criança que poderiam apresentar influência na colonização por SM e/ou na maturação da resposta imune adaptativa de mucosas. Além disto, informações sobre o grau de escolaridade das mães e outras características sócio-econômicas foram obtidas nestas entrevistas.

4.1.3. Coleta das amostras bucais para análises microbiológicas e imunológicas.

Amostras bucais foram coletadas das crianças, com auxílio de espátulas de madeira esterilizadas. Após umedecidas com saliva, as espátulas foram pressionadas dos dois lados sobre o dorso da língua e a seguir pressionadas em placas de contato (Rodac) contendo meio de cultura ágar Mitis-Salivarius (Difco Lab, EUA) contendo 15% de sacarose (Sigma, EUA) e 0,2 U/ml de bacitracina (Sigma) por ml (MSB), como descrito anteriormente (Kohler & Bratthall, 1979). As placas foram transferidas para o laboratório de microbiologia (FOP-UNICAMP) dentro do período máximo de 1h e incubadas a 37°C, em chama de vela, durante 48 a 72 horas.

Após a primeira coleta de amostra bucal, uma segunda amostra de saliva foi obtida com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de polietileno estéril. As amostras de saliva foram coletadas da região do assoalho bucal e volumes de aproximadamente 250 a 500ul foram transferidos para microtubos esterilizados gelados, contendo 10 µL de solução de EDTA 250mM, os quais eram imediatamente transferidos para gelo. A adição de EDTA para uma concentração final de aproximadamente 5 a 10mM EDTA visa à inibição de IgA proteases e a precipitação de mucinas salivares (Fitzsimmons *et al.*, 1994). As amostras de saliva foram transportadas ao laboratório em gelo e clarificadas através da centrifugação a 4°C a 13.000 rpm durante 10 min, sendo os sobrenadantes congelados a -70°C para ensaios futuros.

4.1.4. Exames clínicos intra-bucais.

Após a coleta das amostras salivares, os rodets gengivais foram higienizados com gaze e água filtrada e os dentes irrompidos limpos com uma escova dental infantil de cerdas macias. As regiões interproximais dos dentes irrompidos também foram limpas com fio dental. Após a higienização, as superfícies dentárias foram secas com gaze para a realização dos exames clínicos intra-bucais, com o auxílio de espelho bucal plano número 3 e luz artificial (lanterna portátil). A partir da inspeção visual, foram registrados em fichas clínicas, o número de dentes irrompidos e a presença eventual de lesões de cárie. Dentes foram registrados como irrompidos se qualquer parte das coroas pudesse ser observada. As lesões de cárie inicial foram definidas como lesões de mancha branco-opacas (não indicativas de hipoplasias de esmalte) e registradas como MB. As lesões de cárie cavitadas (C) foram consideradas quando qualquer sinal de cavitação fosse visualmente detectado. Em caso de dúvidas, a superfície dentária examinada foi considerada como hígida. Todos os exames bucais foram realizados por um único examinador (Alessandra Castro Alves [A.C.A.]), previamente treinado e calibrado.

4.1.5. Condições de cultivo e isolamento de estreptococos do grupo mutans.

As placas tipo Rodac contendo MSB (Difco) foram incubadas em estufa a 37°C, em condições de microaerofilia (chama de vela) durante 48h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de colônias com morfologia típica de estreptococos do grupo mutans, com o auxílio de lupa estereoscópica (Carl-Zeiss). Quando nenhum crescimento bacteriano era observado, a placa era incubada por mais 24 horas.

As contagens das colônias de SM foram realizadas em uma área pré-determinada a partir das extremidades das impressões das espátulas de madeira. Oito colônias, de cada criança, foram aleatoriamente selecionadas (quando presentes) e semeadas em placas de Petri contendo ágar Mitis-Salivarius (MSA). As placas foram então incubadas a 37°C em estufa de CO₂, durante 24 horas. As culturas foram então congeladas em microtubos estéreis contendo 1ml de Skim milk (Difco) a 1%, a uma temperatura de – 20° C. A pureza das culturas foi verificada através do cultivo das mesmas em meio não seletivo THA (de *Todd Hewith Agar*, Difco). O teste da produção de catalase também foi realizado, assim como o exame de esfregaços corados por Gram. Nos casos de identificação de contaminações, as cepas de estreptococos do grupo mutans eram re-isoladas e sua morfologia re-analisada em culturas em MSA. A identificação dos genótipos de SM através da técnica do AP-PCR, foi realizada através de estudo paralelo pela doutoranda Alessandra Castro Alves, relacionado ao presente estudo.

4.1.6. Análise dos níveis de imunoglobulinas presentes nas amostras salivares coletadas.

As concentrações salivares de anticorpos IgA, IgA1 e IgM foram determinadas em um total de 432 amostras salivares coletadas no início do estudo (T0), e nas três visitas subseqüentes (T6, T12 e T18), através de ensaios de ELISA de captura, utilizando-se placas de ELISA de 96 poços de poliestireno de alta afinidade a proteínas (Costar, EUA).

4.1.6.1. Análises dos níveis de anticorpos IgA na saliva

As placas de ELISA foram sensibilizadas com uma solução de anticorpo IgG de cabra anti-IgA humana purificado (Zymed, EUA) na concentração de 2 µg/ml, diluído em tampão I (carbonato-bicarbonato pH 9.6), durante incubação por 2,5 h a 37°C, seguida de incubação a 4°C durante 14 a 16 h. A seguir, as placas foram lavadas durante 3 min., por 3 vezes, com tampão II (contendo 0,9% NaCl, 0,05% Tween 20 e 0,02% azida sódica). Os poços foram então bloqueados com 100µl de solução de BSA a 0,1% em tampão III (PBS pH 7.5), durante 1 h, sob agitação, em temperatura ambiente. Após nova série de lavagens com tampão II, 100µl das amostras salivares diluídas 1:200 em tampão III foram adicionadas por poço em triplicata e as placas foram então incubadas durante 2 h a temperatura ambiente e sob agitação. Diluições seriadas de IgA humana purificada (Sigma) (nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/ml) e de uma amostra de saliva controle de adulto foram aplicadas em duplicata às placas, para determinação de uma curva de concentração de IgA humana e controle de reprodutibilidade dos ensaios.

Após incubação com as salivas e padrão de IgA purificada, as placas foram lavadas por 3 vezes durante 3 minutos com tampão II. Adicionaram-se 100 µl por poço de solução 1:14.500 de anticorpos IgG de cabra anti-IgA humana conjugado com biotina (Sigma) e as placas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente, sob agitação e, a seguir, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com solução de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma) diluída 1:500 em tampão III durante 18h, em temperatura ambiente. Após nova série de lavagens, as reações de ELISA foram reveladas pela incubação com substrato p-nitrofenilfosfato (Sigma), na concentração de 1mg/ml diluído em tampão IV (0,2 M Na₂CO₃, 0,2 M NaHCO₃ e 0,02% MgCl) pH 9,8 (Sigma)

(Smith *et al.*, 1990). Esta reação, com o substrato, ocorreu durante incubação por 30 minutos em temperatura ambiente e as absorbâncias ($A_{405\text{nm}}$) medidas em leitor de ELISA (VersaMax, Molecular Devices, EUA). Como controles negativos, foram utilizados poços das mesmas placas não sensibilizados e poços sensibilizados, mas não incubados com saliva. Os valores médios de absorbância dos controles negativos foram descontados dos valores da absorbância das amostras testadas, sendo estes últimos expressos como unidades de ELISA. Uma curva de concentração de IgA por unidade de ELISA foi determinada a partir das reações das amostras de IgA purificada (Sigma). Esta curva foi utilizada para determinação das concentrações de IgA nas amostras de saliva.

4.1.6.2. Análise dos níveis salivares de IgA subclasse 1 (IgA1).

A proporção da subclasse IgA1 em relação aos níveis de IgA total foi determinada através de ensaios de ELISA de captura realizados de forma semelhante aos ensaios descritos no item 4.1.6.1. As placas foram sensibilizadas com IgG de cabra anti-IgA humana e, após incubação com saliva, a detecção de IgA1 foi realizada com anticorpos monoclonais IgG1 anti-IgA1 humana (Zymed) na diluição de 1:500. O anticorpo de detecção utilizado foi então o anticorpo de cabra anti IgG1 de camundongo conjugado com biotina (Zymed) diluído 1:10000. Para as curvas padrões foram utilizadas diluições seriadas de IgA humana purificada (Sigma).

4.1.6.3. Análise dos níveis salivares de IgM.

Os níveis de IgM na saliva foram determinados seguindo-se protocolo semelhante ao descrito no item 4.1.6.1. Para isto, utilizaram-se anticorpos monoclonais de

camundongo IgG1 anti IgM humana (Zymed), nas diluições 1:500. A seguir, foram feitas incubações com anticorpos anti-IgG1 de camundongo conjugados com biotina (Zymed) na concentração de 1:10.000, e as reações reveladas como anteriormente. Curvas padrão foram obtidas, utilizando-se amostras de IgM humana purificada (Sigma) nas concentrações de (0,5; 0,25, 0,125, 0,062 e 0,031 µg/ml).

4.1.7. Análise das concentrações de proteínas das amostras salivares.

Para controle da interferência de variações do fluxo salivar nos níveis totais de IgA, as quantidades de IgA salivar determinadas nos ensaios de ELISA foram normalizados pelas concentrações de proteína das amostras de saliva testadas. Para isto, as concentrações de proteínas salivares foram determinadas através do método de Bradford, utilizando-se os reagentes do kit de Bradford Sigma (Sigma). Resumidamente, 1ml de saliva clarificada diluída (1:161) em água destilada foi misturada a 1 ml de reagente de Bradford em cubetas plástica descartável. Após incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos, as absorbâncias das amostras (A_{595nm}) foram medidas em espectrofotômetro digital (Micronal B 342 II).

Uma curva padrão, de concentração de proteínas, foi obtida a partir da medida das A_{595nm} de 5 diluições seriadas de BSA (Sigma) em concentrações entre 10 a 1,25 µg/ml. A linearidade das reações foi determinada a partir da equação de regressão linear da curva de BSA ($r= 0,9996$, $y=0,0375x+0,0194$), a qual foi utilizada para determinação das concentrações de proteínas das amostras salivares. Como controle negativo utilizou-se

volumes de água destilada iguais aos das amostras de saliva diluídas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.8. Análise da complexidade de resposta de IgA contra Ags de SM em ensaios de western blot.

4.1.8.1. Seleção do subgrupo de crianças para análise do padrão de resposta de anticorpos contra Ags de SM.

Para analisar, a influência do sistema imune de mucosa, na infecção por SM, um subgrupo de 42 crianças, consistindo 21 pares de crianças, foi selecionada em T0 e T6 que foram pareadas para diminuir as diferenças entre as crianças. Cada par incluiu uma criança precocemente infectada (determinado pelos exames microbiológicos realizados em T0, T6, T12 e T18) e uma criança não infectada durante este mesmo período, mas de mesma idade, sexo, padrão racial, número de dentes irrompidos e níveis salivares de IgA da criança infectada. Após 18 meses de acompanhamento, 15 pares permaneceram no estudo, sendo que destes, apenas 8 pares sustentavam a condição de infecção. Os padrões de especificidade de IgA salivar contra diferentes preparações de Ags de SM e *S. mitis* foram então comparados entre os grupos infectados e não infectados, como descrito a seguir.

4.1.8.2. Seleção e preparação dos Ags de SM e *S. mitis*.

As crianças de cada um dos 21 pares tiveram os padrões de especificidade determinados para Ags extraídos de genótipos distintos de SM: uma cepa padrão -3VF2 (Mattos-Graner *et al.*, 2004), e uma cepa representativa de cada genótipo de SM isolado da

criança infectada de cada par (determinados por AP-PCR por A.C.A) em T0 ou T6. Assim, reações contra pelos menos 2 cepas distintas foram testadas para cada criança. O número máximo de quatro cepas SM foi testado naquelas crianças colonizadas por três genótipos distintos de SM. Como controle, reações de IgA salivar contra Ags da cepa *S. mitis* ATCC903, um colonizador primário da cavidade bucal, também foram testadas para todos os pares durante todas as visitas.

Para preparação dos extratos protéicos, utilizaram-se culturas das cepas de SM e *S. mitis* em caldo THB (de *Todd Hewith Broth*, Difco) obtidos após incubação a 37°C durante 20h em 10% CO₂. Células de 15ml das culturas com absorbâncias ajustadas para A_{600nm}=1 foram então separadas através de centrifugação a 1.000xg a 4°C. A seguir, os sobrenadantes foram desprezados. Os precipitados celulares foram ressuspensos em tampão Laemmli (BioRad, EUA) e fervidos durante 5 minutos, para extração das proteínas e inativação de proteinases. A seguir, os extratos foram imediatamente colocados em banho de gelo. Após nova centrifugação a 1.000 xg (a 4°C), os sobrenadantes contendo proteínas de superfície foram transferidos para novos microtubos. A determinação das concentrações de proteínas foi realizada através do método de Bradford (Sigma). O total de 16µg de proteína destes extratos foi aplicado por canaleta e as proteínas separadas eletroforéticamente em géis SDS-PAGE a 6%. Para a análise do padrão de Ags extraídos, estes géis foram incubados com solução de 7% ácido acético e 10% metanol, durante 15 minutos e, a seguir, corados por 2 horas com solução de Coomassie Blue filtrado (0,1% Coomassie Blue, 50% metanol e 10% de ácido acético). Após isto, os géis foram novamente incubados com solução descorante (7% de ácido acético e 10% de metanol)

durante 18h. Os géis foram então lavados com solução de glicerol a 10% e secados entre folhas de celofane.

4.1.8.3. Análise da complexidade da resposta de IgA salivar contra Ags de SM e de *S. mitis* em ensaios de western blot.

Para analisar a influência dos padrões de especificidade da resposta de IgA a Ags de SM nos níveis de infecção por estes microrganismos, os experimentos de western blot foram realizados com alíquotas das salivas estocadas a -70°C (item 4.1.3), coletadas nas fases T0, T6, T12 e T18, dos pares selecionados. Para isto, 16µg de proteínas de cada uma das preparações de Ags (itens 4.1.8.2), foram separadas durante 3 horas a 24 mA/gel em géis de poliacrilamida-SDS a 6%, preparados com auxílio de sistema de mini-géis Mini Protean II (BioRad). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) durante 2h (50V constantes), com auxílio de aparato Mini Trans Blot (BioRad). Padrões de pesos moleculares pré-corados (BioRad) foram incluídos em todos os géis.

As membranas de nitrocelulose contendo os Ags de SM foram coradas com corante Red Ponceau (Sigma) para análise da transferência. Após lavagem do corante, as membranas foram bloqueadas a 4°C, durante aproximadamente 18h, com tampão de bloqueio TBST pH 7,5 contendo 5% de leite desnatado. A seguir, as membranas foram incubadas com as salivas diluídas 1:100 no mesmo tampão, durante 2 horas, em temperatura ambiente e sob agitação. Como controles negativos, membranas duplicata foram incubadas apenas com TBST com 5% de leite. Após 5 lavagens de 10 minutos cada com TBST pH 7,5, as membranas foram incubadas por 2 horas, sob agitação, em

temperatura ambiente, com anticorpo IgG purificado de cabra anti-IgA humana conjugado com peroxidase (Zymed), diluído 1:4000 em TBST com 5% de leite. Após nova série de 5 lavagens, as reações com anticorpo secundário foram então reveladas usando-se o sistema quimioluminescente ECL (Amersham Pharmacia, EUA). Para isto, as membranas do mesmo par de crianças foram incubadas durante 1 minuto em temperatura ambiente, com a solução de detecção do ECL e a seguir expostas ao mesmo filme de raios X, durante 5 min. Após a revelação dos filmes sensibilizados, imagens digitais de alta resolução dos mesmos foram capturadas em scanner de densitometria (BioRad GS-700, Imaging Densitometer), as quais foram aplicadas nas análises dos padrões de Ags reconhecidos e obtenção das medidas de intensidade das bandas reativas.

As posições de migração dos três grupos principais de Ags de virulência de SM (AgI/II, Gtfs e GbpB) nos extratos foram determinadas em ensaios paralelos de western blot, realizados com anti-soro policlonal específico para GbpB (gentilmente fornecido pelo Dr. Daniel J. Smith, The Forsyth Institute, Boston, MA, EUA), anticorpo monoclonal anti-Gtfc P72 (gentilmente cedido pelo Dr. Kasuo Fukushima, Universidade de Matsudo, Chiba, Japão) ou com anti-soro de coelho específico para AgI/II (gentilmente fornecido pelo Dr. Michael W. Russell, Universidade Estadual de Nova Iorque, Búfalo, NY, EUA).

Para confirmar a intensidade das reações de IgA salivar específica a GbpB, também foram realizados ensaios de western blot utilizando-se saliva de crianças que demonstraram forte reatividade com GbpB em extratos de SM, em membranas contendo apenas GbpB purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também fornecida pelo Dr. Daniel J. Smith, The Forsyth Institute.

4.2. PARTE II.

Os ensaios para determinação da reatividade de anticorpos salivares IgA a diferentes peptídeos derivados de GbpB foram realizados com auxílio da tecnologia de citometria de fluxo de microesferas fluorescentes Luminex¹⁰⁰ do Departamento de Imunologia do The Forsyth Institute de Boston, Massachusetts, EUA. A escolha desta tecnologia surgiu da necessidade de se avaliar a reatividade a vários antígenos (seis peptídeos sintéticos da GbpB) a partir de volumes muito pequenos das amostras salivares.

Este sistema consistiu da análise de citometria de fluxo de microesferas fluorescentes, capaz de discriminar mais de 100 antígenos diferentes ligados a estas microesferas de poliestireno, discriminadas por cores específicas, como suporte sólido para um imuno-ensaio convencional (como, por exemplo, ELISA). As microesferas de cada tipo sensibilizadas com seus respectivos antígenos são misturadas em um único poço, contendo um pequeno volume de amostra biológico. Estas microesferas têm 5,5 µm de diâmetro e contêm grupos carboxilados na sua superfície que podem ser ligadas covalentemente aos grupos amins dos antígenos. Associado a este sistema de esferas que se desenvolve em uma placa de 96 poços, há o equipamento Luminex como mostrado na Figura 6, que possui um programa de computador dotado de um hardware denominado Flowmetrix e um software desenvolvido pela Luminex Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos. Desta maneira, o Luminex é programado e controlado por este sistema operacional computadorizado, baseado em uma citometria de fluxo, fornecendo, em tempo real, a classificação da microesfera pela cor e a análise da reação desta com a amostra, simultaneamente. Assim foram analisadas as imuno-reações com todos os peptídeos testados a partir de uma única amostra de saliva.



Figura 6 – Equipamento Luminex¹⁰⁰ (Luminex Corp.) utilizado para as análises de especificidade de IgA salivar em imuno-reações com seis peptídeos sintéticos derivados da sequência de GbpB.

4.2.1. Elaboração dos peptídeos derivados da GbpB.

4.2.1.1. Rastreamento das regiões da sequência protéica da GbpB com prováveis afinidades ligantes a MHC classe II.

Vários peptídeos identificados pela suas afinidades às fendas das moléculas de MHC de classe II formadas pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ foram derivados da GbpB. A ligação entre as sequências de peptídeos e alelos do MHC II, pode ser determinada pela interação das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo com os sítios ligantes nas moléculas do

MHCII, utilizando-se de recursos de bioinformática (Epimatrix). A característica do peptídeo, de provável ligação a um dado alelo do MHC pôde ser deduzida a partir de um *pool* de seqüências de alelos de MHC, que resultaram em uma probabilidade estimada de ligação (Smith *et al.*, 2003a; Smith *et al.*, 2005). Então, a fim de identificar potenciais epítomos de células B dentro da seqüência da GbpB, que podem ser utilizados em vacinas de subunidades, este sistema computadorizado, para predição de epítomos (EpiMatrix) foi usado para pesquisar as seqüências primárias dos aminoácidos para conhecidos sítios ligantes do MHC de classe II pela empresa de informática em imunologia EpiVax, Inc. (Providence, RI, EUA). Este procedimento analisou as seqüências de GbpB contra cada alelo do MHC II para indicar regiões que contenham “clusters” de peptídeos ligantes (Smith *et al.*, 2003a; Smith *et al.*, 2005).

4.2.1.2. Construção dos peptídeos

Os peptídeos construídos foram sintetizados pela AnaSpec (San José, CA, EUA) como múltiplos peptídeos antigênicos (MAP). Os peptídeos construídos utilizando-se o método de fase sólida de Merrifield (1963) foram purificados e ligados a uma matriz central de resíduos de lisina (Tam, 1988). Assim cada MAP continha uma matriz de três resíduos de lisina ligados a 4 cópias do peptídeo. Segundo Tam (1988), os peptídeos em complexos MAP induzem a maior produção de anticorpos contra o peptídeo construído, podendo portanto ser empregados na construção de vacinas.

Um total de 6 peptídeos, derivados da seqüência da GbpB, foram empregados na síntese de 6 MAPs distintos, como mostrado na Tabela 1. Os MAPs foram purificados (>90%) por HPLC e submetidos a análises de espectrometria de massa.

Tabela 1 - Sequência de aminoácidos dos peptídeos construídos a partir de regiões da GbpB que possuem possíveis epítomos ligantes do MHC classe II.

Nome do peptídeo	Sequência do peptídeo	Posição na sequência primária da GbpB (resíduos)
QGQ	AQAQVNTI QGQ VSALQTQQAE	52-71
VAR	QTLSSKIV ARN ESLKQQARSAQ	92-111
SYI	NAAT SYI NAIINSKSVSD	113-132
QAA	QAA QAQAAANNNTQATDA	252-270
ANY	YVTGVQGGQIQVQE ANY AG	390-409
SIG	SIG NYRGWFNPGSVSYIYPN	412-431

Nota: em negrito estão destacados os resíduos referentes às denominações de cada peptídeo

4.2.2. Análise da resposta de imunoglobulinas A da saliva de crianças aos peptídeos sintéticos em complexos MAP.

4.2.2.1. Preparação dos peptídeos acoplados às microesferas.

Sete tipos (cores) de microesferas diferentes foram selecionados para este estudo, cada tipo foi respectivamente sensibilizado por um dos seis MAPs (nomeados pelo peptídeo em complexo: QGQ, VAR, SYI, QAA, ANY e SIG), sendo o sétimo tipo, não sensibilizado, como controle negativo. As intensidades das imuno-reações foram determinadas pelas intensidades da fluorescência de R-ficoeritrina (PE de *R-PhycoErythrin*) nos comprimentos de onda correspondentes a cada tipo de microesfera. Para isto, alíquotas 200µl das suspensões das esferas em solução contendo mercúrio (contendo aproximadamente $1,25 \times 10^7$ microesferas/ml de diâmetro de 5,5 µm) foram centrifugadas por 2 minutos a 1000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf, Alemanha). Após

remoção do sobrenadante, o “pellet” de microesferas foi ressuspendido em água destilada, sonificado por 20 segundos (VWR International, EUA), agitado em vortex (VWR International) e centrifugado novamente. As microesferas foram então ressuspensas com 160 µl de tampão de ativação (0,1M NaH₂PO₄ [pH 6,2]) (Sigma), 20µl de solução de 0,05 mg/ml de hidrocloreto de carbamida 1-etil-3-(dimetilaminopropila) (EDC: Pierce Chemical Corporation, EUA) e 0,05 mg/ml de N-hidroxilsulfossuccinamida (Sigma). As suspensões foram incubadas no escuro por 20 minutos, sob agitação constante, a temperatura ambiente. A seguir, as microesferas foram lavadas duas vezes com tampão de cobertura MES (0,05M de ácido etanosulfônico 2-(N-morfolino); pH 5,0 [Sigma]). Cada tipo de microesfera foi então, ressuspensa no mesmo tampão (MES) acrescidos de 1µg/ml dos respectivos MAPs. Após incubação no escuro, à temperatura ambiente, sob agitação por 2 horas, as microesferas acopladas foram lavadas por quatro vezes com tampão de bloqueio PBS-BN (NaCl 0,138 M; KCl 0.0027 M contendo 1% de BSA, 0,05% de Tween 20 e 0,05% azida sódica, pH 7,4) [Sigma]). A seguir, as microesferas foram ressuspensas no mesmo tampão e estocadas a 4°C, no escuro. As concentrações das soluções de cada microesfera foram determinadas usando-se um hematocitômetro (Bright Line; VWR International).

4.2.2.2. Preparação das amostras salivares e das microesferas acopladas com o peptídeo

Amostras salivares foram diluídas a 1:8 em tampão PBS–BN e filtradas em filtros Spin X (Corning Incorporated, EUA) de poros de 0,45 µm de diâmetro. Iguais concentrações de cada tipo de microesfera previamente sensibilizadas com seus respectivos

MAPs, ou não sensibilizadas (controle negativo), foram misturadas em um único tubo e acrescidas de tampão PBS-BN. Esta mistura foi posteriormente distribuída nos poços contendo cada uma das amostras salivares previamente diluídas, para as imuno-reações, como descrito a seguir.

4.2.2.3. Imuno-reações entre as amostras salivares e os peptídeos sintéticos acoplados às esferas.

Os imuno-ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo formado por membranas filtrantes de poros de 1,2 µm de diâmetro (Millipore Corporation, EUA). As membranas destas placas foram previamente lavadas,, por duas vezes, com PBS-BN, com auxílio de sistema de filtração a vácuo (Millipore). O total de 50 µl da mistura de microesferas foi aplicado em cada poço. Após agitação em um agitador orbital (VWR International) por 90 segundos, o líquido foi removido por filtração a vácuo e as esferas foram acrescidas de 50 µl de tampão PBS-BN e ressuspendidas sob agitação por 30 segundos a 1000 rpm. Cinquenta microlitros das amostras salivares diluídas filtradas foram então, aplicadas nestes poços, e as placas incubadas por 2 horas, sob agitação de 300 rpm, no escuro e em temperatura ambiente. Após a incubação com as salivas, as placas foram submetidas novamente a vácuo, para remoção da solução e as esferas lavadas por 2 vezes com PBS-BN, utilizando-se o mesmo sistema de filtração. Após as lavagens, adicionaram-se por poço, 50 µl de solução de anticorpo monoclonal de cabra anti-IgA humana (GAHA de *Goat Anti Human immunoglobulin A* [Jackson ImmunoResearch, EUA]) na diluição de 1:500 em PBS-BN. As esferas foram então incubadas por 30 minutos à temperatura

ambiente, em escuro, sob agitação. Após isto, as esferas foram novamente lavadas por duas vezes e incubadas com anticorpo monoclonal de asno anti IgG de cabra conjugado com R-ficoeritrina (PE-DAGG de *R-PhycoErythrin conjugated Donkey Anti Goat immunoglobulin G*; [Jackson ImmunoResearch]) numa diluição de 1:250 em PBS-BN. Após mais 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente em escuro, as esferas foram lavadas duas vezes sob filtração e ressuspensas com 100µl de PBS-BN. Após agitação vigorosa (por 90 seg. a 1000 rpm), para dispersão das microesferas, as placas foram inseridas no equipamento Luminex¹⁰⁰ (Luminex¹⁰⁰ flow analyser), para determinação das medidas de imuno-fluorescência para cada tipo de esfera.

4.2.2.4. Determinação das intensidades de reação de IgA salivar com os peptídeos de GbpB

As mensurações das intensidades das imuno-reações com anticorpos conjugados com R-ficoeritrina (PE) foram determinadas para cada tipo de esfera, com auxílio do sistema Luminex. Através deste sistema, foram medidas as intensidades 100 microesferas de cada um dos tipos utilizados, as quais foram separadas segundo seus diferentes comprimentos de onda de fluorescência interna. A partir disto, valores arbitrários de fluorescência de PE foram fornecidos para cada peptídeo, os quais correspondiam ao valor mediano entre as reações obtidas de 100 microesferas de mesmo tipo. Para isto, as suspensões de esferas presentes em cada poço, foram aspiradas das placas e transportadas para um compartimento interno do equipamento Luminex, o qual emite dois tipos de laser, como ilustrado na Figura 7. Um, dos dois tipos diferentes de laser, detecta a intensidade de

luz emitida pelo anticorpo conjugado com R-ficoeritrina (PE), enquanto que o outro tipo de laser detecta a fluorescência interna da esfera (discriminatório do tipo de esfera).

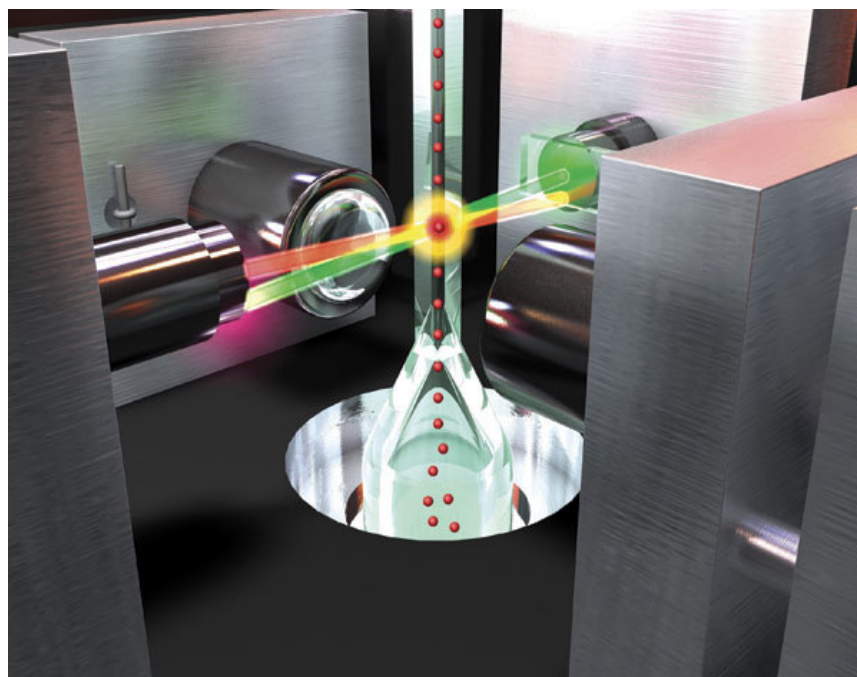


Figura 7 - Imagem representativa dos dois tipos laser emitidos pelo Luminex para discriminação das microesferas e determinação das intensidades de emissão de luz pela reação entre IgA salivar específica aos peptídeos acoplados, revelados por anticorpos conjugados com R-ficoeritrina.

Desta maneira, o primeiro laser excita as moléculas fluorescentes (PE), ligadas à superfície da microesfera e o segundo laser excita os fluorocromos encaixados internamente nas microesferas e que as classificam em diferentes tipos, os quais são importantes para a separação através de filtros seletivos. Os sinais de fluorescência de R-ficoeritrina (PE) são então discriminados para cada tipo de microesfera utilizada e

convertidos em Unidades de Fluorescência Relativa (UFR) por um processador de sinais digitais.

4.3. Análises Estatísticas.

Diferenças na frequência de crianças com IgA específicos para os antígenos de SM (AgI/II, Gtfs e GbpB) *S. mitis* (Ag de 45kDa) entre os grupos infectados e não infectados foram avaliadas através do teste de Qui-quadrado. Diferenças nos valores médios de densitometria dos Ags reativos entre os grupos de crianças infectadas ou não foram avaliadas através de teste de variância não paramétrico de Mann-Whitney. As associações entre os números de Ag de SM e *S. mitis* reconhecidos por IgA foram analisadas através do teste de correlação de Pearson. A semelhança de resposta de IgA de uma mesma criança a extratos de antígenos obtidos de genótipos distintos foi analisada através da comparação das razões entre o número de bandas reativas para todos os genótipos e o número máximo de bandas identificada no genótipo mais reativo.

Diferenças nos valores médios de Unidades de Fluorescência Relativa (UFR) resultantes das imuno-reações entre IgA e os peptídeos sintéticos derivados da GbpB, entre os grupos de crianças infectadas ou não foram também avaliadas através do teste de Mann-Whitney. Adotou-se o valor de alfa de 5% para que as variações fossem consideradas estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS.

5.1. Níveis salivares de IgA, IgA1 e IgM

A Figura 8 mostra as flutuações dos níveis das imunoglobulinas A (A), imunoglobulina A1 (B) e imunoglobulina M (C) nas amostras salivares coletadas das crianças na primeira visita (T0) e nas visitas subsequentes (T6, T12 e T18). Houve uma alta variabilidade nas concentrações de IgA, IgA1 e IgM nas 119 crianças acompanhadas durante os 18 meses de estudo, mesmo quando estas concentrações foram normalizadas pela concentração de proteínas salivares.

As médias das concentrações de IgA e IgA1 aumentaram gradualmente de T0 a T18. Assim, as médias das concentrações em T0 foram 82,4 µg/ml ($\pm 54,4$); 43,4 µg/ml ($\pm 50,0$) para IgA total e IgA1 respectivamente, e em T18, estas médias aumentaram respectivamente para 823,4 µg/ml ($\pm 228,2$); 518,7 µg/ml ($\pm 198,0$). O mesmo aumento aconteceu para a concentração média de proteínas, que aumentou de 695,2 µg/ml ($\pm 388,7$) em T0 para 1428,1 µg/ml ($\pm 794,0$) em T18. As médias das razões de IgA e IgA1 normalizados pelas concentrações de proteínas também aumentaram de T0, 0,15 ($\pm 0,15$) e 0,09 µg/ml ($\pm 0,14$) respectivamente, para T18, 0,69 ($\pm 0,30$) e 0,43 µg/ml ($\pm 0,20$) respectivamente. Os níveis de IgA1 representaram, em média, 50% da concentração total de IgA em T0, o que aumentou para 94,7 ($\pm 46,9$), 87,0 ($\pm 48,0$) e 63,0% ($\pm 20,0$) em T6, T12 e T18 respectivamente.

Os níveis de IgM não foram detectados na maioria das amostras de saliva coletadas, a partir da segunda visita (T6). As concentrações médias de IgM foram de 4,2

$\mu\text{g/ml}$ ($\pm 6,4$), $0,0 \mu\text{g/ml}$ ($\pm 2,8$), $2,5 \mu\text{g/ml}$ ($\pm 6,0$) e $0,9 \mu\text{g/ml}$ ($\pm 2,3$) respectivamente para T0, T6, T12 e T18.

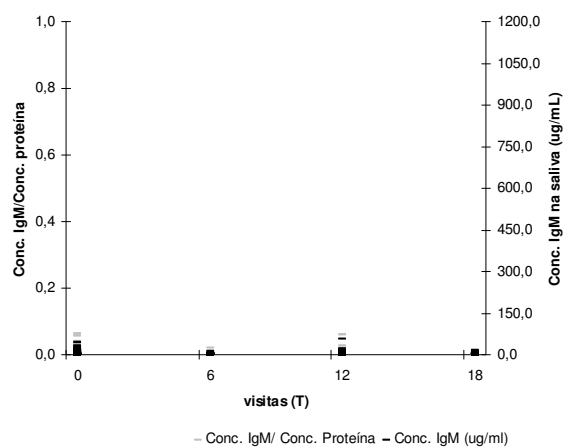
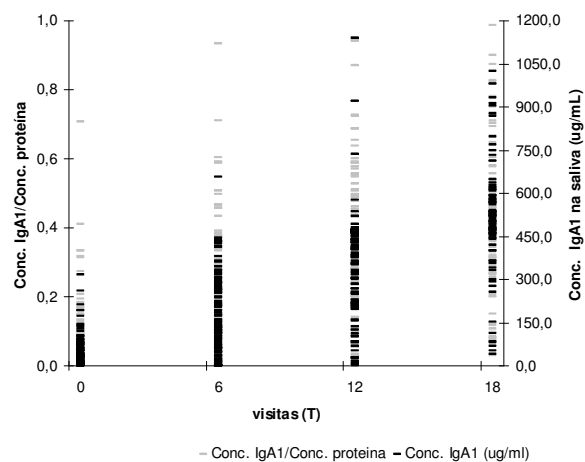
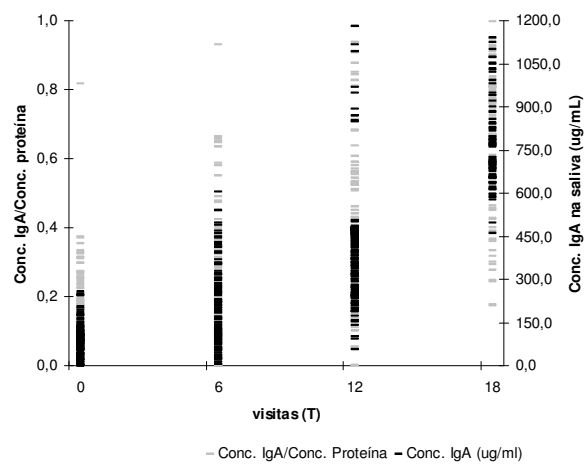


Figura 8 - Níveis de IgA (A), IgA1 (B) e IgM (C) nas amostras salivares das crianças em T0, T6, T12 e T18. Os traços pretos representam os valores absolutos das imunoglobulinas (ug/ml). Os traços cinza representam as concentrações de imunoglobulinas normalizadas pelas concentrações de proteínas nas amostras.

Entre os 21 pares de crianças infectadas e não infectadas entre T0 e T6, 15 pares permaneceram até o final do estudo. No subgrupo de 15 crianças infectadas precocemente por SM e não infectadas, os níveis medianos de IgA e IgA1 aumentaram de T0 (129,4 µg/ml e 117,2 µg/ml, respectivamente) para T18 (880,0 µg/ml e 536,8 µg/ml respectivamente), não diferindo estatisticamente dos valores medianos das 15 crianças não infectadas, que foram em T0 (208,4 µg/ml e 158,1 µg/ml, respectivamente) para T18 (832,5 µg/ml e 625,1 µg/ml respectivamente). Nestes 15 pares de crianças (n=30) os níveis de IgA1 representaram 50,0, 81,7, 73,3 e 62,0% do total da concentração de IgA em T0, T6, T12 e T18 respectivamente.

5.2. Infecção por SM e experiência de cárie dos pares de crianças infectadas e não infectadas por SM no início do estudo.

No início do estudo (T0), SM foram detectáveis em 5 (3,1%) crianças. Após 6 meses de acompanhamento (T6), um total de 21 crianças (14,9%) apresentaram níveis detectáveis de SM. A idade média de infecção foi de 17 meses. Neste subgrupo de 21 crianças, a infecção por SM variou de baixos níveis (1 ufc) a altos níveis (>100 ufc) (mediana=40 ufc por área determinada). Os níveis médios de infecção por SM em T0 foram de 5,7 ufc/área ($\pm 22,0$), e em T6 foram de 44,5 ufc/área ($\pm 40,6$).

Ao final do estudo (T18), 12 crianças (pares números: 5, 9, 11, 14, 16 e 19), foram removidas dos 21 pares pré-selecionados, por terem saído das EMEIs ou por não estarem presentes no dia da visita as EMEIs. Assim permaneceram ao final do estudo, subgrupos de 15 crianças precocemente infectadas com seus respectivos pares não

infectados (subgrupo não infectado). Destas, 6 crianças (com 1 a 50 ufc de SM/área) não mantiveram níveis detectáveis de infecção em T12 e T18 (crianças dos pares números: 1, 2, 3, 4, 17 e 21; Tabela 3). No subgrupo de 15 crianças não infectadas, quatro delas, apresentaram níveis detectáveis de SM entre T12 e T18 (pares números: 2, 3, 13 e 21; Tabela 3). Desta maneira em T18, oito pares de crianças sustentavam suas condições de infecção ou não por SM (pares números: 6, 7, 8, 10, 12, 15, 18 e 20).

Os níveis de SM variaram de 1 a >100 ufc de SM em T12 e T18, e os níveis médios de infecção para as crianças infectadas (n=8) foram 38,0 ufc/área ($\pm 39,3$) e 23,9 ufc/área ($\pm 42,4$) em T12 e T18 respectivamente.

As porcentagens de crianças infectadas (n=8) que apresentaram lesões de cárie (manchas brancas e lesões cavitadas) foram 4,8, 26,7, 65,0 e 60,0% em T0, T6, T12 e T18 respectivamente. Em T0, apenas 1 criança, pertencente ao par 5, apresentou 4 manchas brancas e 2 lesões cavitadas. Após 6 meses (T6), os índices de cárie (ceos) variaram de 1 a 10 manchas brancas (média: $0,8 \pm 2,3$) e somente 1 criança, pertencente ao par 5 apresentou 6 lesões cavitadas. Os índices de cáries em T12 variaram de 1 a 9 cavidades (média: $1,0 \pm 2,8$) e 1 a 16 manchas brancas (média: $2,6 \pm 4,1$) e em T18 variaram de 1 a 5 cavidades (média: $0,6 \pm 1,4$) e 1 a 12 manchas brancas (média: $1,8 \pm 3,5$).

Dentre o grupo de 15 crianças não infectadas, que permaneceram até o final do estudo, nenhuma delas apresentou sinais de cárie em T0. Em T6, duas (9,5%) crianças (pares números 7 e 13; Tabela 3) apresentaram-se com manchas brancas. Em T12, manchas brancas foram detectadas somente na criança número 13, pois as lesões detectadas em T6, na criança número 7, haviam regredido. Neste mesmo grupo (não infectadas), a criança

pertencente ao par 13 também apresentou uma lesão cavitada. Em T18, duas crianças (pares números: 13 e 17; Tabela 3) apresentaram lesões de manchas brancas e três cavidades foram detectadas nas crianças números 13 e 21. A criança número 3 apresentou somente uma cavidade. Destas crianças que apresentam lesões cariosas (cavidades e manchas brancas), os pares números: 3, 13 e 21 (Tabela 3), apresentaram níveis detectáveis de SM a partir de T12, e por este motivo, foram excluídas da análise.

Não houve diferenças no número de dentes erupcionados entre as crianças selecionadas nos subgrupos de 8 pares de crianças infectadas e não infectadas. Os valores medianos, do número de dentes erupcionados, foram de 5, 12, 16 e 19 em T0, T6, T12 e T18 respectivamente. Ao final do estudo (T18), a dentição decídua completa (20 dentes erupcionados) foi verificada em 8 e 6 crianças dos subgrupos de não infectados (n=8) e infectados (n=8) respectivamente.

5.3. Resposta imunológica à infecção inicial por SM (T0 e T6) nos 21 pares de crianças infectadas e não infectadas.

5.3.1. Complexidade de resposta de IgA aos antígenos (Ags) de SM e *S. mitis*

A Figura 9 mostra uma alta complexidade da especificidade de anticorpos salivares IgA aos Ags de SM (definida pelo número de bandas IgA-reativas), em crianças a partir dos 6 meses de idade. O nível de complexidade, no entanto, foi muito variável entre as crianças estudadas. A complexidade da resposta em T0 e T6 não foi associada com a idade em cada período, nem com os níveis bucais de SM (Correlação de Pearson; $R = -0,21$

a – 0,10, $p > 0,4$, para Ags da cepa padrão 3VF2 de SM). O número de bandas IgA-reactivas observado para extratos da cepa 3VF2 variaram de 0 a 13 (média: $7,2 \pm 3,8$) e de 0 a 14 (média: $6,3 \pm 3,8$) em T0 e T6 respectivamente. Não houve diferenças significativas no número médio de Ags IgA-reactivos entre os subgrupos de 21 crianças infectadas e 21 crianças não infectadas (Mann-Whitney: $p > 0,6$).

O número de bandas de *S. mitis*, reconhecidas por anticorpos IgA, variaram de 0 a 17 (média: $7,2 \pm 4,7$), e de 1 a 19 (média: $8,2 \pm 4,2$) em T0 e T6 respectivamente. O grau de complexidade de resposta a SM esteve associado com a complexidade de resposta a *S. mitis* em ambas as fases do estudo (Correlação de Pearson; $r = 0,37$ e $0,40$ respectivamente para T0 e T6; $p < 0,02$). A comparação dos padrões de desenvolvimento de anticorpos salivares IgA contra Ags de SM e *S. mitis* em T0 e T6 indicaram que as especificidades de resposta, a estas duas espécies bacterianas, não se relacionaram, exceto para um único antígeno de *S. mitis* de aproximadamente 44,9 kDa, o qual foi frequentemente reconhecido quando havia anticorpos IgA na mesma amostra salivar, específicos contra a GbpB de SM. As reações ao Ag de 44,9 KDa de *S. mitis* não pareceram estar relacionadas a reações cruzadas, uma vez que, as reações de anticorpos policlonais específicos contra a GbpB não reconheceram o antígeno de 44.9 KDa de *S. mitis* (Figura 9D).

A Figura 10 mostra que uma intensidade similar de resposta de anticorpos IgA contra as cepas de SM e *S. mitis* na saliva de indivíduos adultos e a saliva de uma criança de 15 meses de idade, a qual faz parte do grupo não infectado.

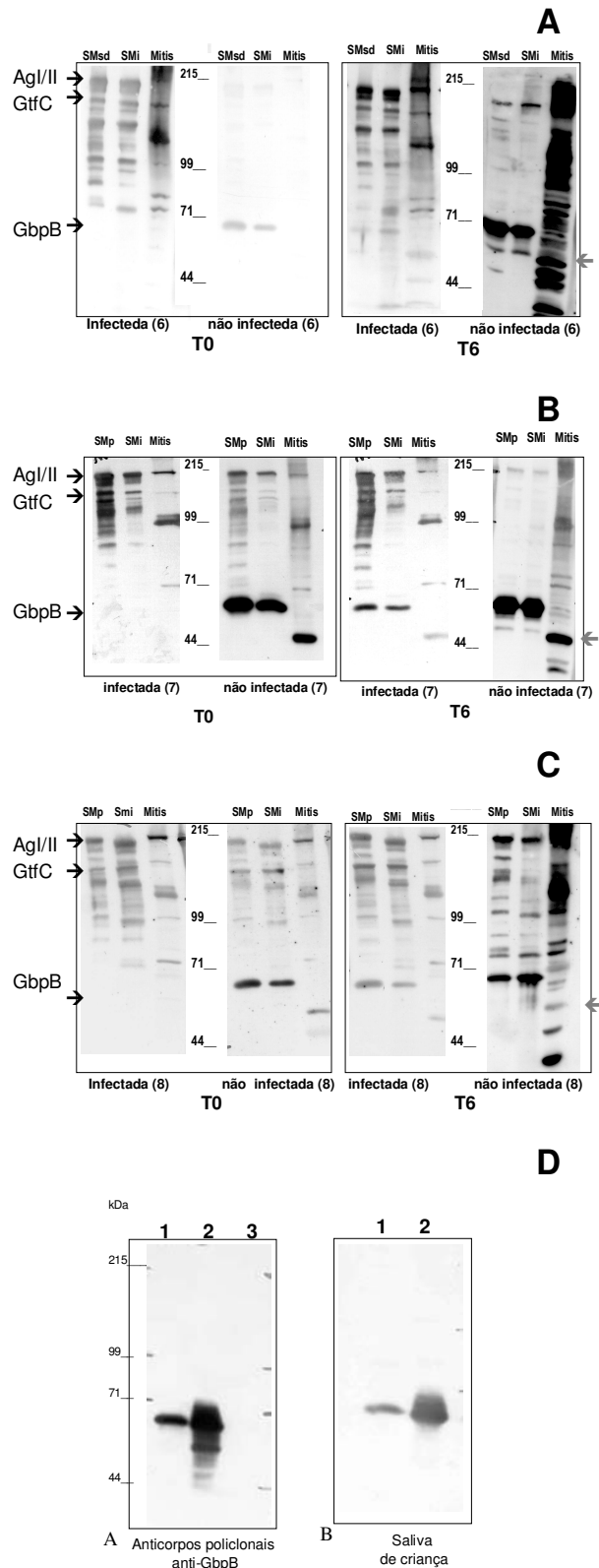


Figura 9 A-C: Padrões de reatividade de anticorpos IgA salivares com antígenos extraídos de cepas SM em três pares de crianças (infetadas e não infetadas). O número de cada par é indicado entre parênteses. SMp: Ags da cepa SM 3VF2. SMi: Ags de um genótipo de SM isolado da criança infetada de cada par. Mitis: Ags extraídos da cepa *S. mitis* ATCC903. Membranas dentro dos quadros à esquerda e à direita correspondem às imuno-reações com salivas coletadas no início do estudo (T0) e após 6 meses de acompanhamento (T6), respectivamente. Padrões de peso molecular (kDa) estão indicados entre as membranas de cada período. Setas pretas à esquerda indicam as posições dos antígenos AgI/II, GtfC e GbpB nos extratos de SM. Setas cinzas à direita indicam Ag de aproximadamente 45,0 kDa da cepa de *S. mitis*. D: Análise da especificidade de reação de IgA salivar à GbpB. DA: Imuno-reação com anticorpos policlonais específicos para GbpB, canaletas 1, 2 e 3 correspondem ao extrato protéico da cepa 3VF2, GbpB purificada por FLPC e extrato da cepa de *S. mitis*, respectivamente. B: Imuno-reação com saliva de uma criança da amostra. Canaletas 1e 2 ao extrato protéico de SM e GbpB purificada por respectivamente.

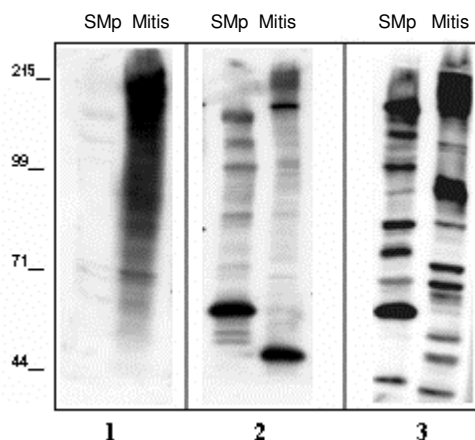


Figura 10 - Padrões de especificidade de anticorpos IgA contra as cepas SMp e Mitis na saliva de dois indivíduos adultos (membranas 1 e 2 respectivamente) e com a saliva de uma criança de 15 meses de idade, a qual faz parte do grupo não infectado (par 14) (membrana número 3). Padrões de peso molecular (KDa) estão indicados na esquerda das membranas.

5.3.2. Variação antigênica entre os genótipos de SM.

Diferenças entre os antígenos reconhecidos por IgA entre cepas indígenas representativas de genótipos distintos de SM (identificados por ensaios de AP-PCR) isolados das crianças infectadas de cada par e a cepa padrão (3VF2) foram analisadas através da comparação dos padrões de migração das bandas reconhecidas. A porcentagem média de bandas coincidentes entre as cepas pelo total de bandas reativas detectadas foi de 77,5, 67,0, 68,5 e 65,5% nas fases T0, T6, T12 e T18 respectivamente. Exemplos de ensaios de western blot, comparando as cepas padrão e isoladas das crianças infectadas estão ilustrados na Figura 11.

Os números totais de bandas reativas do genótipo padrão (3VF2) e do genótipo infectante estiveram altamente associados em ambas as fases T0 e T6 (Correlação de Pearson; r : 0,81, $p < 0,001$ e r : 0,69; $p < 0,001$ respectivamente). Os padrões de antígenos específicos reconhecidos pela IgA, foram também comparados entre cepas infectantes representativas de cada genótipo de SM, entre as 6 crianças do subgrupo infectado que albergavam mais de um genótipo de SM (Figura 11). Dois a quatro genótipos distintos foram identificados nestas 6 crianças por AP-PCR. As reações dos anticorpos IgA reativos aos Ags AgI/II, Gtfs e GbpB foram muitos semelhantes em frequência e intensidade entre estes genótipos, mesmo quando pequenas diferenças no padrão de migração destes Ags ocorreram, como por exemplo, para o Ag GbpB identificado no genótipo SM7 da criança do subgrupo infectado do par 17 (Figura 11).

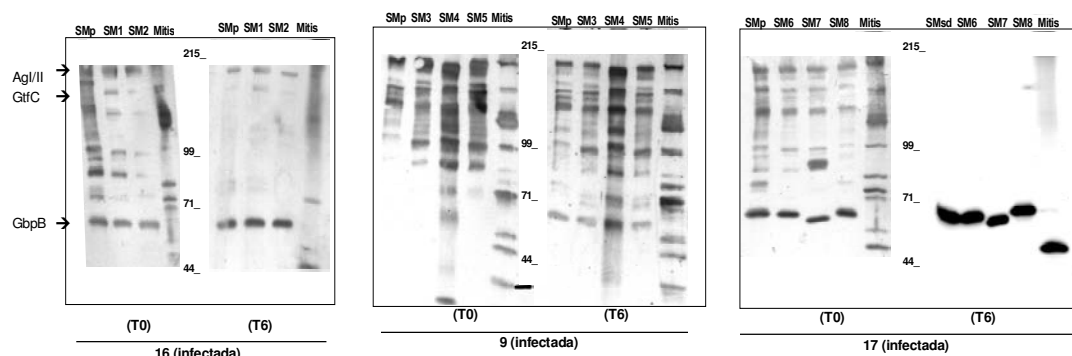


Figura 11 - Comparações dos padrões de reatividade de anticorpos IgA da saliva a Ags de genótipos de SM distintos isolados de três crianças representativas do subgrupo de crianças infectadas (dos pares número 18, 9 e 17), as quais foram infectadas por dois a três genótipos distintos. Reações foram realizadas com as salivas coletadas de cada criança no início do estudo (T0) e após 6 meses (T6). SMp: cepa padrão 3VF2; genótipos clínicos foram numerados de 1 a 8 para cada criança. Mitis: cepa padrão de *S. mitis*. Padrões do tamanho molecular (KDa) estão indicados entre as imuno-reações de T0 e T6.

5.3.3. Níveis dos anticorpos específicos ao AgI/II, Gtfs e GbpB.

As identidades do AgI/II, das Gtfs e da GbpB, nos extratos de Ags de todos genótipos de SM testados, foram confirmados em ensaios paralelos de western blot, utilizando-se os respectivos anticorpos específicos. Imuno-reações representativas, com anticorpos específicos para estes Ags estão ilustradas na Figura 12. As variações dos padrões de migração foram superiores para o AgI/II (Figura 12). O tamanho deste Ag variou entre 176,6 a 200,5 kDa, quando calculado com base no peso padrão de proteínas. As migrações para GtfC foram menos variáveis, com um peso aproximado de 158,9 kDa, enquanto que a migração da GbpB foi compatível com tamanhos de 62,9 a 58,5 kDa.

Variações nas intensidades de cada Ag entre os extratos também foram detectadas (Figura 12).

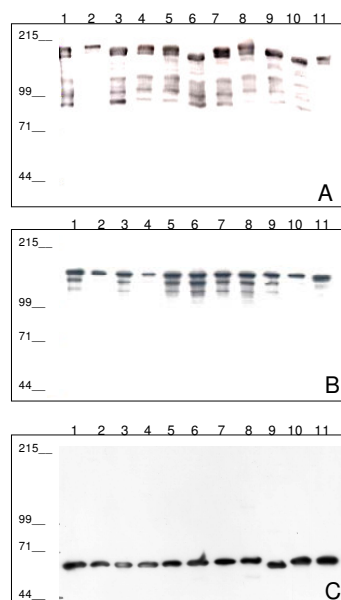


Figura 12 - A-C- Identificação dos antígenos AgI/II, GtfC e GbpB em extratos dos genótipos SM com anticorpos específicos. Os números, acima de cada canaleta, indicam diferentes genótipos testados. A: Imuno-reação com anticorpo policlonal anti-AgI/II. B: Imuno-reação com anticorpo monoclonal anti-GtfB. C: Imuno-reação com anticorpos policlonais específicos para GbpB. Os marcadores padrão de tamanho molecular (KDa) estão indicados à esquerda.

O número de crianças que apresentaram anticorpos IgA na saliva específicos para cada um destes Ags está representado na Tabela 2. A frequência de resposta de IgA salivar a AgI/II e as Gtfs não variou entre os subgrupos de 21 crianças infectadas e não infectadas por SM (Tabela 2). No entanto, observou-se uma diferença significativa na frequência de resposta a GbpB, entre as crianças infectadas e não infectadas na fase T0 (Tabela 2; qui-quadrado: 6,07; $p < 0,02$). Neste período, apenas 38,1% ($n=8$) das crianças infectadas com cepas SM ($n=21$) demonstraram possuir anticorpos IgA reativos com a

GbpB. Diferentemente, 76,2% (n=16) das salivas de crianças não infectadas (n=21) apresentaram anticorpos IgA reativos com este antígeno na mesma fase. Após 6 meses de acompanhamento (T6), a frequência de detecção de anticorpos IgA reativos contra GbpB foi semelhante entre os grupos de crianças infectadas e não infectadas.

Grandes variações nas intensidades das bandas de GbpB, reconhecidas por IgA, foram observadas entre os dois subgrupos de 21 pares de crianças infectadas e não infectadas (Tabela 3). Em T0, as intensidades médias das bandas de GbpB IgA-reativas foram 30,6 ($\pm 54,7$) e 47,5 ($\pm 88,7$) para os subgrupos de crianças infectadas e não infectadas, respectivamente. Em T6, estes valores avançaram para 72,1 ($\pm 108,5$) e 111,2 ($\pm 173,8$) respectivamente. As intensidades das bandas de IgA reativas a GbpB representaram de 50 a 100% da resposta total dos anticorpos IgA reativos aos Ags de SM, em 9,5 e 33,3% dos subgrupos de crianças infectadas e não infectadas, respectivamente. Os valores medianos de intensidade de reação à GbpB com anticorpos IgA, foram menores no subgrupo de crianças infectadas, quando comparadas às crianças não infectadas, tanto em T0 (0,0 *versus* 3,5) quanto em T6 (10,3 *versus* 20,5), embora estas diferenças não tenham sido estatisticamente significantes

Tabela 2-Comparação da frequência de resposta de IgA salivar a diferentes antígenos de SM e de *S. mitis* no início do estudo (T0) e após 6 meses de acompanhamento (T6) entre 21 crianças infectadas com SM em T0 e em T6 e seus respectivos pares não infectados.

Extratos dos antígenos	Número (%) de crianças; média do número de Ags reativos			
	Salivas em T0 de:		Salivas em T6 de:	
	Infectada n (%)	Não Infectada n (%)	Infectada n (%)	Não infectada n (%)
<i>Streptococcus mutans</i>				
Cepa padrão (3VF2)				
Ag I/II	19 (90,4)	17 (81,0)	16 (76,2)	17 (81,0)
Gtfs	17 (81,0)	17 (81,0)	14 (66,7)	14 (66,7)
GbpB	8 (38,1) ^a	16 (76,2) ^a	15 (71,4)	18 (85,7)
Média do número de Ags reativos, ± DP	7,6 ± 3,6	6,9 ± 4,0	6,1 ± 4,2	7,7 ± 3,0
Genótipo infectante^b				
Ag I/II	18 (85,7)	16 (76,2)	16 (76,2)	17 (81,0)
Gtfs	18 (85,7)	16 (76,2)	15 (71,4)	14 (66,7)
GbpB	8 (38,1) ^a	16 (76,2) ^a	15 (71,4)	19 (90,4)
Média do número de Ags reativos, ± DP	6,4 ± 2,8	6,5 ± 3,9	5,8 ± 3,5	5,7 ± 2,3
<i>Streptococcus mitis</i>				
Ag de 44,9 kDa	12 (57,1)	13 (61,9)	18 (85,7)	17 (81,0)
Média do número de Ags reativos, ± DP	6,7 ± 4,7	7,6 ± 4,7	8,5 ± 3,6	8,0 ± 4,8

^a Diferenças entre grupo infectado e não infectados: Qui-quadrado=4.76, p<0.02

^b Somente o genótipo com maior número de bandas IgA-reativas foi selecionado para análise, entre os dois ou mais genótipos testados em crianças infectadas por múltiplos genótipos.

Tabela 3 - Níveis totais de IgA na saliva, intensidade das bandas de GbpB reativas com anticorpos IgA salivares, porcentagem da intensidade com GbpB em relação à soma das intensidades de todas as bandas de SM reconhecidas por IgA em 21 pares de crianças infectadas e não infectadas por SM nos primeiros 6 meses do estudo (de T0 a T6).

Crianças	Idade de detecção inicial de SM (meses)	Conc. IgA (ug/ml) na saliva em:		Intensidades das reações a GbpB ^a em:		% de reação a GbpB em relação a todos os Ags de SM reconhecidos ^a em :	
		T0	T6	T0	T6	T0	T6
Infectadas							
1*	12	52,7	781,7	-	43,0	-	3,1
2*	11	91,0	56,2	90,4	302,8	7,6	18,8
3*	6	61,8	214,3	-	-	-	-
4*	8	79,7	283,4	-	-	-	-
5	13	120,0	616,3	-	-	-	-
6	18	20,2	317,1	-	8,5	-	1,5
7	19	1,5	466,1	-	32,0	-	10,3
8	17	131,4	100,2	-	37,0	-	13,8
9	14	19,6	249,4	-	11,7	-	14,5
10	16	512,0	512,0	-	2,3	-	6,5
11	19	108,3	744,0	219,9	149,1	20,7	9,0
12	16	45,9	536,5	79,7	42,3	15,2	12,2
13	19	18,7	58,9	105,0	342,0	18,7	93,6
14	13	77,4	498,8	-	9,1	-	16,0
15	14	94,1	482,4	-	-	-	-
16	19	83,9	443,8	22,3	25,6	8,4	64,4
17*	19	66,9	561,3	31,7	255,2	20,3	100,0
18	20	73,6	576,6	-	-	-	-
19	17	143,1	822,2	-	-	-	-
20	17	246,8	656,0	57,7	33,9	100,0	100,0
21*	21	193,9	601,9	36,1	199,0	69,8	100,0
Não infectadas							
1	-	55,1	732,6	-	54,0	-	8,6
2 ⁺	22	92,3	428,6	22,0	15,3	0,9	1,0
3 ⁺	19	66,1	575,5	-	730,0	-	19,1
4	-	75,2	503,2	-	-	-	-
5	-	104,8	348,1	86,1	120,1	15,1	100,0
6	-	19,6	426,4	27,0	315,0	64,5	64,4
7	-	3,6	598,9	312,0	400,0	59,9	91,4
8	-	88,5	727,0	87,0	119,8	50,0	20,5
9	-	-	663,6	6,8	50,3	3,5	39,2
10	-	87,1	347,4	13,7	53,0	2,1	19,7
11	-	104,4	320,5	13,5	-	1,1	-
12	-	55,3	495,8	-	48,0	-	11,0
13 ⁺	31	4,6	454,7	-	90,8	-	17,4
14 ⁺	27	85,4	565,4	270,3	82,3	21,8	20,0
15	-	85,2	261,3	-	-	-	-
16	-	89,8	619,2	5,0	37,9	1,4	35,2
17	-	64,5	446,7	4,0	21,2	31,0	95,1
18	-	82,1	418,3	0,8	84,0	100,0	24,5
19	-	116,1	754,4	2,4	16,0	100,0	100,0
20	-	256,7	484,2	134,2	10,4	76,3	80,0
21 ⁺	32	113,0	142,4	9,3	88,1	80,2	78,6

* crianças com níveis não detectáveis de SM após um ano de acompanhamento (T12).

⁺ crianças com níveis detectáveis de SM após um ano (T12).

^a intensidades determinadas através da densitometria das bandas de cada antígeno reativo com anticorpos salivares IgA.

5.4. Evolução da resposta dos anticorpos salivares IgA aos Ags de SM e *S. mitis* nos pares de crianças selecionadas em T0 e T6, durante os 18 meses de acompanhamento.

5.4.1. Complexidade da resposta de anticorpos salivares IgA a Ags de SM e *S. mitis* para os 8 pares de crianças acompanhadas até o final do estudo.

Quinze pares de crianças, dos 21 pares selecionados inicialmente, permaneceram durante o acompanhamento de 18 meses, e destes, 8 pares sustentaram as condições de infecção ou não por SM, durante todas as visitas, como descrito no item 5.2. Desta maneira, os ensaios de western blot, realizados com as salivas destas 16 crianças, coletadas nas quatro visitas, permitiu-nos analisar e comparar a evolução da resposta imunológica aos Ags de SM e *S. mitis* em crianças infectadas e seus respectivos pares não infectados.

Não houve diferença estatisticamente significativa no número de anticorpos IgA reativos aos Ags totais de SM e de *S. mitis* entre as 8 crianças infectadas e seus respectivos pares não infectados (Mann-Whitney U-test, $p>0.6$). A complexidade de resposta de IgA aos Ags totais de SM diminuiu após 12 meses de acompanhamento em todas as 16 crianças (Figura 16). O número médio de bandas IgA reativas aos Ags de SM (3VF2) nas 16 crianças analisadas variaram de 7,3 ($\pm 4,5$) e 7,1 ($\pm 4,0$) em T0 e T6 respectivamente, para 1,8 ($\pm 1,3$) e 1,1 ($\pm 1,2$) em T12 e T18 respectivamente.

O número de bandas IgA reativas aos Ags totais de *S. mitis* também variaram durante o acompanhamento, sendo que as médias de bandas reativas para as 16 crianças foram de 6,3 ($\pm 4,0$), 9,6 ($\pm 4,4$), 7,3 ($\pm 5,5$) e 2,3 ($\pm 2,2$) respectivamente para T0, T6, T12 e T18. O grau de complexidade de resposta de IgA a Ags de SM esteve associado à

complexidade de resposta de IgA a Ags de *S.mitis* em todas as fases de acompanhamento (Correlação de Pearson, r: 0.64, $p<0.02$; r: 0.56, $p\leq 0.02$; r: 0.54, $p\leq 0.02$ e r: 0.8, $p<0.02$, para T0; T6; T12 e T18 respectivamente).

5.4.2. Níveis dos anticorpos específicos a AgI/II, as Gtfs e a GbpB.

As respostas de anticorpos salivares IgA para o AgI/II e para a Gtf, nas salivas dos 8 pares de crianças infectadas ou não com SM, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes com relação a presença infecção, durante todo o acompanhamento. As porcentagens médias destas crianças (n=16) que apresentaram anticorpos salivares IgA reativos ao AgI/II foram 75,0, 87,5, 25,0 e 6,3% nas fases T0, T6, T12 e T18 respectivamente. As porcentagens médias de crianças (n=16) que apresentaram IgA reativo a Gtf foram 75,0, 81,3, 50,0 e 18,7% para T0, T6, T12 e T18 respectivamente.

A frequência de anticorpos IgA reativos a GbpB foi significativamente maior entre as 8 crianças do grupo não infectado (n=6), quando comparadas com o grupo de 8 crianças infectadas (n=2) (Qui-quadrado: 6.07, $p<0.04$) em T0. Assim, somente 25,0%, das crianças infectadas com SM, apresentaram IgA reativo a GbpB, enquanto que, 75,0% das crianças não infectadas até o final do estudo, apresentavam anticorpos IgA reativos a GbpB. Seis meses após o início do estudo (T6), as frequências de detecção de IgA reativos a GbpB para os 8 pares infectados e não infectados, foram respectivamente 75,0 e 87,5%. Em T12, estes valores se alteraram para 62,5 e 75,0% respectivamente e em T18, para 62,5 e 50,0% respectivamente. Desta maneira, as frequências de detecção de anticorpos IgA reativos a GbpB foram similares entre as 16 crianças pertencentes aos 8 pares de infectados ou não-infectados, entre as fases T6, T12 e T18, como consequência de um aumento da

resposta de IgA a GbpB encontrado em T0 entre as crianças infectadas precocemente por SM. A evolução da resposta de anticorpos IgA aos Ags de SM e do *S. mitis* durante as quatro visitas, nos 8 pares de crianças infectadas e não infectadas pode ser analisada através da Figura 13.

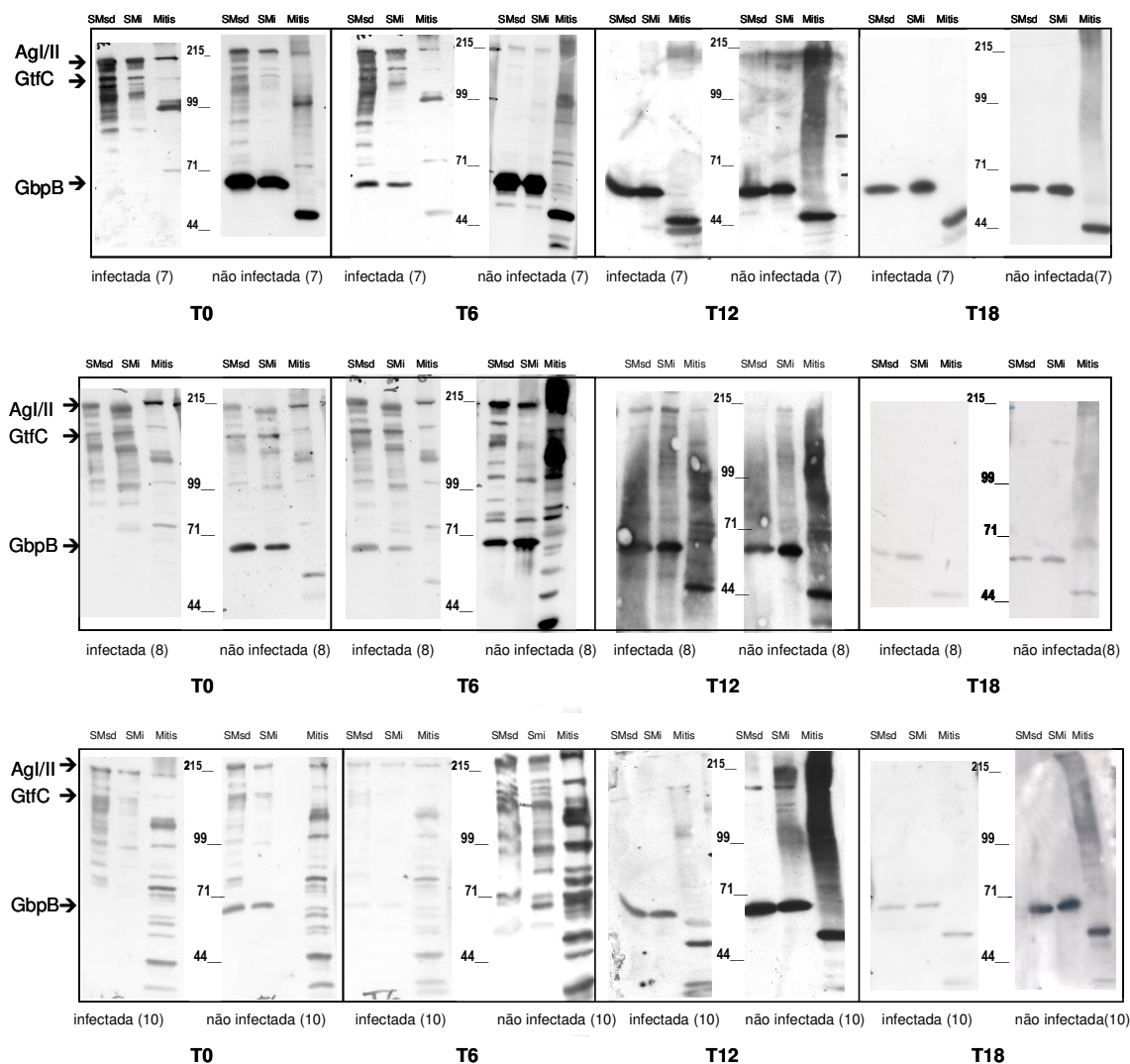


Figura 13 - Padrões de reatividade de anticorpos IgA salivares contra antígenos extraídos de cepas SM em três pares representativos de crianças (infetadas e não infetadas). O número de cada par é indicado entre parênteses. SMp: Ags da cepa SM 3VF2. SMi: Ags de um genótipo de SM isolado da criança infetada de cada par. Mitis: Ags extraídos da cepa *S. mitis* ATCC903. Membranas dentro dos primeiros, segundos, terceiros e quartos quadros correspondem às imuno-reações com salivas coletadas no início do estudo (T0), após 6 (T6), 12 (T12) e 18 meses de acompanhamento (T18), respectivamente. Padrões de peso molecular (KDa) estão indicados entre as membranas de cada período. Setas pretas à esquerda indicam as posições dos antígenos AgI/II, GtfC e GbpB nos extratos de SM.

Tanto no grupo de 8 crianças infectadas, quanto no grupo de 8 crianças não infectadas, observaram-se variações nas intensidades de reação de IgA aos antígenos Ag I/II, GTF e GbpB durante o acompanhamento. Grande variação também foi observada com relação da resposta de IgA aos Ags de *S. mitis* (Figura 14). As intensidades médias de IgA reativos com Ag I/II (Figura 14A), Gtf (Figura 14B), e todos os Ags de SM (Figura 14C) e de *S. mitis* (Figura 14D) não diferiram estatisticamente entre os 8 pares de crianças infectadas e não infectadas durante todo acompanhamento (Mann-Whitney, $p>0.1$). Desta maneira, as intensidades médias das bandas de AgI/II reativas, entre as 16 crianças acompanhadas, foram 33,4 ($\pm 33,5$) em T0; 45,3 ($\pm 55,9$) em T6; 11,9 ($\pm 25,6$) em T12 e 7,9 ($\pm 31,8$) em T18. As intensidades médias de reação com Gtf foram 34,1 ($\pm 38,4$), 27,3 ($\pm 30,9$), 10,6 ($\pm 16,2$) e 2,8 ($\pm 6,2$) em T0, T6, T12 e T18 respectivamente. As médias das somas das intensidades de todas as bandas reativas no extrato de SM (3VF2) foram 190,9 ($\pm 27,7$), 218,0 ($\pm 73,1$), 182,0 ($\pm 20,5$) e 89,6 ($\pm 18,8$), nos respectivos períodos de T0, T6, T12 e T18. As médias das somas das intensidades de reação de todos os antígenos (representado pelas bandas reativas) de *S. mitis*, foram 318,9 ($\pm 34,1$), 597,4 ($\pm 436,4$), 774,9 ($\pm 565,4$) e 559,3 ($\pm 527,0$) em T0, T6, T12 e T18 respectivamente.

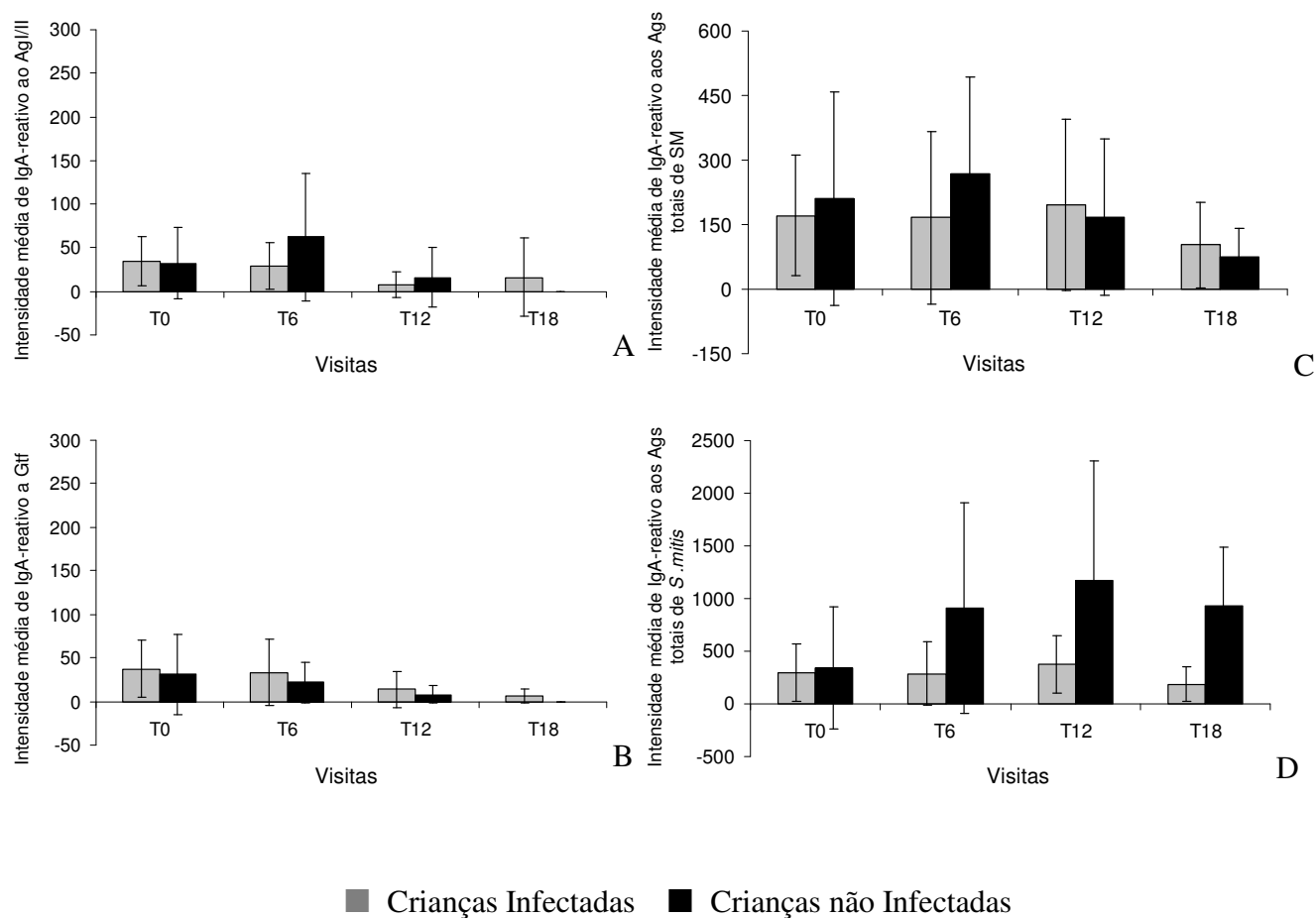


Figura 14 – Comparações das intensidades médias de resposta de anticorpos IgA reativos contra Ag I/II (A), Gtf (B), todos Ags de SM (C) e todos Ags de *S. mitis* (D) entre as 8 crianças infectadas (em cinza) e seus respectivos pares não infectados (em preto) As colunas representam os valores médios de intensidade. As barras acima de cada coluna indicam os desvios padrão.

As intensidades médias de resposta contra GbpB foram diferentes entre as 8 crianças não infectadas, quando comparada com as 8 crianças infectadas durante T6 (Figura 15). A intensidade média de resposta de IgA a GbpB entre as crianças infectadas e não infectadas foram respectivamente 16,1 ($\pm 30,0$) e 58,9 ($\pm 88,3$) em T0. Em T6 as intensidades médias foram 17,8 ($\pm 15,6$) e 133,9 ($\pm 153,9$) (Mann-Whitney, $p < 0,02$) respectivamente (Figura 15). Em T12, as intensidades médias de reação ainda foram

superiores entre as 8 crianças não infectadas ($109,0 \pm 144,6$), quando comparadas com as 8 crianças infectadas ($81,9 \pm 85,7$), embora esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 15). Entretanto, em T18 a diferença nas intensidades de resposta à GbpB entre os 8 pares de crianças foi invertida ($57,8 \pm 57,7$ e $47,1 \pm 63,3$ para crianças infectadas e não infectadas, respectivamente) (Figura 15).

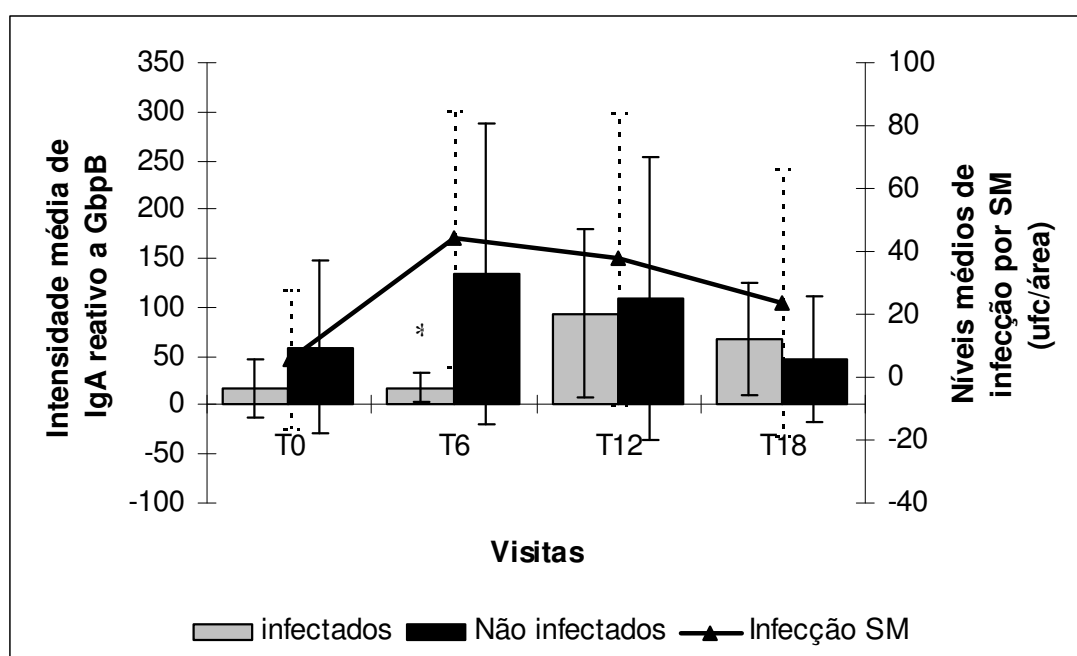


Figura 15 - Comparações das intensidades médias de reação de anticorpos IgA contra GbpB (barras, escala à esquerda) entre crianças infectadas ($n=8$) e crianças não infectadas ($n=8$). O nível médio de infecção por SM no grupo infectado (linha, escala à direita) é representado para cada fase do estudo (T0, T6, T12 e T18). As barras sobre colunas ou pontos da linha indicam os desvios padrão.

Os anticorpos IgA reativos a GbpB representaram 50 a 100,0% da resposta total dos anticorpos IgA aos Ags de SM em 8,5 e 29,3% dos subgrupos infectados (n=8) e não infectados (n=8) respectivamente em T0. Após 6, 12 e 18 meses, estas porcentagens aumentaram para 23,8 e 33,3%, 61,3 e 53,8 % e 75,0 e 50,0% respectivamente para as 8 crianças infectadas e 8 não infectadas.

As intensidades medianas das bandas de GbpB reativas com anticorpos IgA foram menores no subgrupo de infectados (n=8) do que nos não infectados (n=8) em ambas fases T0 (0,0 *versus* 6,8) e T6 (25,6 *versus* 53,0), mas houve uma inversão em T12 (71,8 *versus* 63,3) e T18 (51,6 *versus* 1,6).

A Figura 16 mostra as razões entre as intensidades de reação dos antígenos de SM (AgI/II, GbpB, Gtf e Ags totais) e de *S. mitis* (Ag de 45 kDa e Ags totais) observadas no subgrupo de crianças não infectadas (n=8), pelas intensidades do subgrupo de crianças infectadas (n=8) em todas as fases do estudo. Pelos dados apresentados na Figura 16, verificou-se que as intensidades de resposta contra aos Ags totais de SM, contra Gtf e contra Ag I/II foram similares entre os 8 pares de crianças infectadas e não com SM. Por outro lado, as razões de intensidade de reação contra GbpB evidenciam que as diferenças de reconhecimento deste antígeno entre os grupos foram maiores entre as fases T0 e principalmente T6. Com relação à intensidade de resposta contra antígenos de *S. mitis*, também não houve diferença entre os 8 pares de crianças para o Ag de 45 kDa. Por outro lado, quando todos os Ag de *S. mitis* foram considerados, observou-se que as crianças não infectadas apresentaram resposta mais intensa a esta espécie quando comparadas com as crianças infectadas por SM na fase final do estudo (T18).

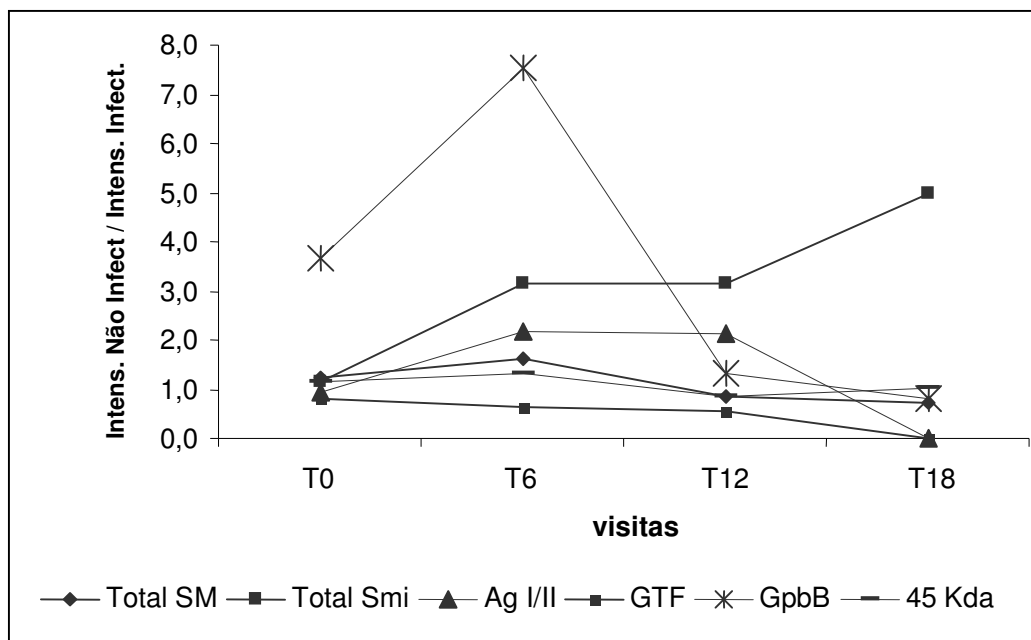


Figura 16 – Razões das intensidades de reação de IgA contra antígenos de SM e de *S. mitis* entre os grupos de crianças infectadas (n=8) e não infectadas por SM (n=8). As linhas representam os valores das intensidades médias das bandas do respectivo antígeno IgA-reactivo observado no grupo de crianças não infectadas, divididos pelos valores de intensidade médios observados entre as crianças do grupo infectado.

5.5. Análise da resposta de IgA aos seis peptídeos sintéticos derivados de diferentes regiões da GbpB de SM.

Amostras de salivas de crianças de dois dos 21 pares selecionados em T0 e T6 (pares números: 7 e 13; Tabela 3), não foram analisadas por não apresentarem volume suficiente para estes ensaios. Assim, 76 amostras salivares foram testadas, coletadas de 19 pares de crianças nos períodos T0 e T6. A Tabela 4 mostra as médias das UFRs (Unidades de Fluorescência Relativa) obtidas das análises de amostras salivares coletadas em T0 e T6, para cada complexo peptídico analisado.

Tabela 4 - Unidades médias de fluorescência relativa (UFR) das imuno-reações das salivas dos subgrupos de crianças infectadas (n=19) e não infectadas (n=19) sobre os complexos de peptídeos da GbpB nas visitas T0 e T6.

Complexos de peptídeos de GbpB analisados em amostras salivares	Unidades de Fluorescência Relativa (UFR) no grupo de crianças:	
	Coletadas em cada visita:	
	Infetadas média ($\pm$ DP)	Não Infetadas média ($\pm$ DP)
<i>Visita T0</i>		
SIG	4,0 ($\pm$ 4,1)*	1,5 ($\pm$ 3,5)*
QGQ	13,2 ($\pm$ 7,6)	8,2 ($\pm$ 9,8)
VAR	5,2 ($\pm$ 4,2)*	1,8 ($\pm$ 2,3)*
QAA	15,2 ($\pm$ 6,5)	12,2 ($\pm$ 6,2)
SYI	17,2 ($\pm$ 7,1)	13,3 ($\pm$ 7,9)
ANY	1,0 ($\pm$ 1,3)	0,6 ($\pm$ 0,9)
<i>Visita T6</i>		
SIG	4,3 ($\pm$ 4,0)	3,2 ($\pm$ 4,6)
QGQ	10,2 ($\pm$ 6,0)	8,1 ($\pm$ 4,7)
VAR	9,8 ($\pm$ 31,7)	1,4 ($\pm$ 1,7)
QAA	11,7 ($\pm$ 7,9)	7,9 ($\pm$ 3,4)
SYI	14,4 ($\pm$ 9,0)	11,8 ($\pm$ 4,5)
ANY	0,9 ($\pm$ 1,2)	0,5 ($\pm$ 1,3)

* Diferença estatisticamente significativa entre crianças infectadas e não infectadas (Mann-Whitney, $p < 0.02$)

Na primeira visita (T0), os peptídeos SYI e QAA reagiram com todas as amostras salivares coletadas (n=38), tanto de crianças infectadas (n=19) como das crianças não infectadas (n=19) com SM. O peptídeo, QGQ, não reagiu com 4 amostras salivares, sendo que destas, três eram salivas de crianças não infectadas com SM. Os demais peptídeos VAR, SIG e ANY, não reagiram com 11 amostras (8 do grupo não infectado), 19 amostras (13 do grupo não infectado) e 23 amostras (13 de do grupo não infectado) respectivamente. Em T6, todas as amostras salivares dos dois subgrupos (n=38) possuíam anticorpos IgA reativos contra os peptídeos SYI, QAA e QGQ. No entanto, SIG, VAR e ANY, não reagiram com 10, 16 e 23 amostras coletadas em T6 respectivamente.

As intensidades médias de resposta de IgA aos peptídeos sintéticos diferiram estatisticamente para os peptídeos SIG e VAR entre as salivas coletadas das 19 crianças infectadas e 19 não infectadas, somente em T0 (Mann-Whitney, $p < 0,02$, Tabela 4). A Figura 17 mostra as médias de intensidade de IgA reativo aos seis peptídeos nas duas vistas (T0 e T6) observadas entre as 38 crianças. O padrão de resposta de IgA nas salivas não variou entre as visitas (Figura 17). Em T0, o peptídeo mais reativo foi o SYI (média: 15,3 ufr $\pm$ 7,7), seguido do peptídeo QAA (média: 13,7 ufr $\pm$ 6,4), QGQ (média: 10,7 ufr $\pm$ 9,0), VAR (média: 3,5 $\pm$ 3,8), SIG (média: 2,8 ufr $\pm$ 4,0) e ANY (média: 0,8 ufr $\pm$ 1,1). Após 6 meses de acompanhamento (T6) um padrão semelhante foi observado. Assim, a intensidade média de reação de IgA maior foi detectada para SYI (média: 13,1 ufr $\pm$ 7,1), seguida pelos peptídeos QAA (média: 9,8 ufr $\pm$ 6,3), QGQ (média: 9,2 ufr $\pm$ 5,4), VAR (média: 5,6 ufr $\pm$ 22,5), SIG (média: 3,8 ufr $\pm$ 4,3) e ANY (média: 0,7 ufr $\pm$ 1,2).

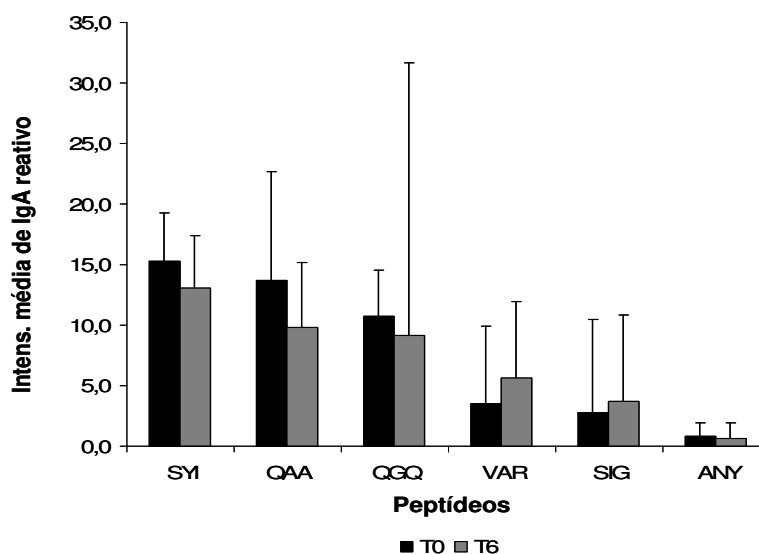


Figura 17 – Comparações entre as intensidades médias de IgA reativo aos diferentes peptídeos detectados em T0 e após 6 meses de idade (T6).

6. DISCUSSÃO

6.1. Influência do sistema imune de mucosas na colonização inicial por *Streptococcus mutans*.

Streptococcus mutans é transmitido para as crianças através do contato com a saliva de indivíduos infectados. Esta bactéria pode ser detectada utilizando-se métodos de cultura dos 19 a 30 meses de idade com uma idade mediana de aproximadamente 26 meses (Caufield *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1998). Em populações com alto risco de cárie, SM podem ser detectados, em alta frequência, no final do primeiro ano de vida (Mattos-Graner *et al.*, 2001a; Mattos-Graner *et al.*, 2004) ou mesmo, em crianças edêntulas, com 5 a 6 meses de idade (Milgrom *et al.*, 2000). Em casos severos de desenvolvimento de cárie, SM pode compreender até 60% do total dos organismos cultiváveis no biofilme dental (Van Houte *et al.*, 1982).

A população estudada foi definida como altamente exposta ao SM, pois estudos prévios mostraram uma detecção mais precoce de SM em amostras salivares (durante os primeiros 18 meses de vida) e altos níveis de infecção estiveram significativamente associados com uma alta incidência de cárie (Mattos-Graner *et al.*, 1998; Mattos-Graner *et al.*, 2001a). Estudos nesta população indicaram, ainda, que a infecção precoce estava associada a fontes maternas de infecção (Klein *et al.*, 2004) e possivelmente não-maternas (Mattos-Graner *et al.*, 2001c; Klein *et al.*, 2004). Além disto, a dieta rica em sacarose, oferecida nas EMEIS, que consistia em 10 refeições diárias, talvez contribuam para a infecção mais precoce (Mattos-Graner *et al.*, 2001a).

O presente estudo confirmou a precocidade de infecção desta população, pois a idade mediana de detecção inicial de SM no subgrupo de crianças infectadas, foi de 17

meses, a qual foi anterior às idades descritas em outras populações (Caufield *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1998). A análise prospectiva da amostra estudada revelou que níveis detectáveis de SM puderam ser observados a partir dos primeiros 6 meses de idade (5,6% das crianças entre 5 a 13 meses – T0), sendo estes microrganismos detectados até mesmo na ausência de dentes irrompidos. A prevalência desta espécie bacteriana aumentou durante o primeiro ano de vida (15,6% das 141 crianças acompanhadas – T6), atingindo uma prevalência de infecção de 33,1% e 41,2% em T12 e T18 respectivamente, quando as crianças apresentam idade entre 17 a 25 meses (T12) e 23 a 31 meses (T18). Excluindo as primeiras cinco crianças do subgrupo de 21 crianças infectadas (dos pares números: números de 1 a 5; Tabela 3), cuja idade mediana de infecção foi de 11 meses, todas as outras crianças apresentaram níveis detectáveis de SM na segunda visita (T6), em uma idade mediana de 17,5 meses. Portanto, neste estudo, fomos capazes de analisar a resposta de anticorpos IgA nas fases de início do desafio de infecção por SM, o qual poderia levar ao estabelecimento destes microrganismos na cavidade bucal. Entre os fatores de influência na susceptibilidade e intensidade de infecção, os comumente estudados são a exposição a indivíduos infectados (Kohler *et al.*, 1988; Li & Caufield, 1995, Klein *et al.*, 2004) e o consumo de sacarose (Van Houte *et al.*, 1982). Embora estudos sugiram que a redução do risco de colonização bucal por SM, após os 2,5 anos de idade, ocorra devido ao estabelecimento de uma microbiota comensal competitiva nas superfícies dentárias recém-irrompidas (Caufield *et al.*, 1993; Caufield *et al.*, 2000), pouco se sabe sobre o papel da maturação do sistema imune de mucosas no estabelecimento de SM na cavidade bucal. Reduções no risco de infecção, por outros patógenos da mucosa respiratória (por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*), observadas

após os 2 anos de idade, têm sido associadas à maturação do sistema imune de mucosas (Faden *et al.*, 1995; Faden *et al.*, 1994; Yamanaka e Faden, 1993).

Dentro do período de acompanhamento dos 6 primeiros meses (T0 e T6) das crianças infectadas por SM, observou-se uma flutuação nos níveis destes microrganismos. Das 9 crianças com níveis detectáveis de SM em T0, 7 não tiveram estes microrganismos detectados após 6 meses. Outras duas crianças mantiveram-se com níveis detectáveis. Uma delas, com 1 ufc de SM em T0, mantiveram-se com 3 ufc de SM em T6. A outra criança apresentou altos níveis de SM aos 13 meses de idade (>100 ufc) em T0, sendo que os níveis de SM foram reduzidos para 23 ufc na visita subsequente (T6). Esta última criança esteve, no entanto, sob antibioticoterapia no período de 2 semanas precedentes ao exame em T6. Destas crianças que foram selecionadas, as quatro primeiras (pares números: 1, 2, 3 e 4, Tabela 3), não apresentaram níveis detectáveis em T12 e T18. Flutuações nos níveis de SM são esperadas, uma vez que microbiota bucal ainda não está totalmente estabelecida nesta faixa etária, quando os dentes estão ainda irrompendo na cavidade bucal. Uma vez que cerca de 89% das crianças infectadas em T0 apresentavam níveis baixos de SM (1 a 3 ufc), espera-se que a própria limitação de sensibilidade do método de coleta contribua para a não detecção de SM em amostras subsequentes. Ressalta-se que SM foram detectados em criança ainda sem dentes irrompidos na cavidade bucal, portanto os genótipos de SM detectados nesta fase poderiam ser transitórios.

Um estudo demonstrou níveis detectáveis de SM em 55% das amostras do dorso de língua em crianças entre 6 a 18 meses de idade em uma população com altos índices de cárie de Saipan, Ilhas Marianas do Norte (Tanner *et al.*, 2002). Neste estudo, técnicas moleculares mais sensíveis de hibridização com sondas de DNA foram utilizadas e

os autores sugeriram que o dorso de língua possa funcionar como um reservatório de SM para posterior colonização dentária. No presente estudo, espátulas de madeira foram pressionadas sobre o dorso da língua para remoção dos excessos de saliva, o que pode ter contribuído para a detecção precoce de SM. Independentemente da transitoriedade ou não das cepas isoladas em T0, nossos dados indicam que as crianças estudadas estão altamente expostas a SM, o que pode influenciar na maturação da resposta imune de mucosas a estes microrganismos. Estas características, de detecção precoce de SM, tornam a população estudada muito interessante para a compreensão da influência da maturação do sistema imunológico adaptativo no processo de aquisição inicial de SM. Estudos neste sentido tornam-se necessários paralelamente aos avanços obtidos quanto a aplicação de vacinas anti-cárie (Russell *et al.*, 1999; Michalek *et al.*, 2001; Smith, 2002; Koga *et al.*, 2002).

O acompanhamento dos níveis de SM nas 8 crianças infectadas mostrou que a fase de maior desafio de infecção foi em T6 (média de microrganismos: 44,5 ufc/ placa), quando as crianças apresentavam uma idade entre 11 e 19 meses. Provavelmente como consequência da infecção precoce, em T12, 65% das crianças deste subgrupo infectado (n=8) apresentou-se com lesões cariosas.

6.2. Concentrações de imunoglobulinas e de proteínas nas amostras salivares.

Em humanos, os plasmócitos secretores de IgA compreendem 50 a 75% de todas as células secretoras de anticorpos, sendo esta classe de anticorpo continuamente secretada nos fluídos gastro-intestinais, saliva, lágrimas, urina e outras secreções (Brandtzaeg, 1984). A IgA-secretora (IgAS) é o principal componente do sistema imune adaptativo de mucosas, consistindo da forma dimérica de IgA associada ao componente

secretor originado das células epiteliais (Smith *et al.*, 2002). As funções principais da IgAS consistem na neutralização de componentes virais e bacterianos, envolvidos na virulência e bloqueio de receptores importantes para a aderência e invasão dos tecidos. Amostras de saliva total apresentam IgAS, mas também IgG, IgM e IgA séricas, as quais atingem a cavidade bucal, principalmente através do fluído crevicular. A IgM, na forma secretora, também pode ser detectada na saliva, principalmente após 2 anos de idade (Gleenson *et al.*, 1995). Por volta dos 9 meses de idade, observa-se que mais de 95% da IgA presente na saliva encontra-se na forma de IgAS, embora em níveis bem inferiores aos detectados em adultos (Smith *et al.*, 1990).

Os níveis totais de IgA salivar têm sido considerados como um indicador do grau de maturidade do sistema imune de mucosas em crianças (Gleeson *et al.*, 1995). Reduções transitórias nos níveis de IgA detectados, na saliva, foram associadas à maior susceptibilidade a infecções do trato respiratório (Gleenson *et al.*, 1995), reforçando a importância da maturação do sistema imune de mucosas na susceptibilidade a infecções. Sabe-se que variações no fluxo salivar influenciam diretamente nas concentrações destes anticorpos. Estas interferências foram controladas pela normalização das concentrações de IgA pelas concentrações de proteína total na saliva. Em nossas amostras salivares, as grandes variações nos níveis de IgA, mantiveram-se mesmo quando corrigidos pelas concentrações de proteína total.

Em adultos, as concentrações de IgA na saliva variam entre 72 g/ml e 410 µg/ml (Brandtzaeg, 1989; Wan *et al.*, 2003). Entre crianças da faixa etária entre 6,5 a 12 anos, observou-se uma concentração média de 201 µg/ml. Níveis inferiores, entre 0 a

50µg/ml de IgA (média: 22,4µg/ml $\pm$ 7,3) foram detectados nas salivas de crianças de 6 a 18 meses de idade, os quais aumentam com a idade (Wan *et al.*, 2003). As concentrações médias de IgA nas salivas testadas em T0 foram de aproximadamente 83 µg/ml, pouco superiores às detectadas nesta faixa etária em estudos anteriores e também aumentaram com a idade (Wan *et al.*, 2003).

Deficiências nas concentrações de IgA salivar pareceram ser compensadas pela produção e secreção de IgM em crianças de maior idade e adultos (Fernandes *et al.*, 1995, Gleenson *et al.*, 1995). Entretanto, este mecanismo compensatório não foi observado em crianças durante os primeiros dois anos de vida (Gleenson *et al.*, 1995). Os nossos dados revelaram um grupo de 13 crianças (8,1%) que não apresentaram níveis detectáveis de IgA salivar (n=10) ou com baixos níveis destes anticorpos (n=3) em T0. As idades destas 10 crianças variaram entre 6 e 13 meses de idade (média: 9,1 meses; $\pm$ 2,8), não diferindo significativamente do restante da amostra. Nestas crianças, não houve efeito compensatório de IgM e nem correlação com infecção pelo SM.

Há pouca informação sobre as proporções das classes de IgA (IgA1 e IgA2) na faixa etária estudada (Childers *et al.*, 2003). As proporções destes isotipos podem também refletir o grau de maturação da resposta imune adaptativa de mucosas, visto que os níveis do isotipo IgA1 diminuem com o aumento da idade, atingindo pequena proporção nas secreções de adultos, onde a maior parte de IgA é da classe IgA2 (Smith & Taubman, 1992). IgA1 corresponde ainda à classe mais susceptível à degradação em ambientes ricos em microrganismos produtores de IgA1-proteases, como as espécies colonizadoras primárias da cavidade bucal (por exemplo, *S. sanguinis*). A subclasse de maior proporção

em todo estudo prospectivo foi a IgA1, o que está de acordo com o padrão de resposta imune nos primeiros anos de vida (Smith & Taubman, 1993; Childers *et al.*, 2003). Em nosso estudo prospectivo, pudemos notar que os níveis de IgA e IgA1 salivares sofreram um aumento crescente de T0 a T6 e de T12 a T18. A subclasse de maior proporção em todas as fases do nosso estudo, foi a IgA1 (média: 75%), como descrito previamente (Smith & Taubman, 1993; Childers *et al.*, 2003) e o decréscimo desta concentração de T12 a T18 (de 87% para 63%) pode ser, em parte, devido ao grau de maturação da resposta imune adaptativa de mucosas (Smith & Taubman, 1992). As análises das proporções de IgM e IgA1 das salivas coletadas em T0, T6, T12 e T18 foram importantes para confirmar que a resposta de Acs salivares a Ags de SM consistiu, em sua maioria, à classe IgA e que as diferenças nos padrões de especificidade a Ags de SM entre os pares de crianças infectadas precocemente e não infectadas não foram decorrentes de deficiências no processo de maturação do sistema imune de mucosas.

6.3. Análise do padrão de resposta de anticorpos IgA salivares a Ags de SM e sua influência na colonização inicial por genótipos de SM.

A análise do padrão de resposta de IgA foi realizada, durante as fases iniciais de exposição à SM, em crianças pareadas quanto a diversos fatores de possível influência na infecção por SM e na resposta imunológica (idade, sexo, padrão racial, número de dentes irrompidos, consumo de sacarose e níveis totais de IgA na saliva). Este tipo de delineamento, associado ao estudo de Ags de virulência específicos, simplificou a identificação de padrões de especificidade de IgA a antígenos de SM.

A intensidade de resposta de anticorpos IgA a vários colonizadores da cavidade bucal tem sido mostrada por aumentar do nascimento até os 4 anos de idade (Smith & Taubman, 1992), o que pode refletir o aumento acumulativo do desafio antigênico (Smith & Taubman, 1992). Por outro lado, anticorpos IgA reativos contra várias outras espécies bacterianas comensais na infância são descritos na ausência de níveis detectáveis das espécies respectivas (Bammann & Gibbons, 1979; Cole *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). Várias hipóteses foram levantadas para explicar esta observação, incluindo a reação cruzada de anticorpos, indução anti-idiotípica, exposição antigênica devido à colonização de outros sítios da mucosa, assim como a ocorrência de infecção transitória e variações na sensibilidade das técnicas de cultura microbiana (Cole *et al.*, 1998; Smith & Taubman, 1992). Estudos da resposta de anticorpos salivares IgA contra Ags conhecidos como espécie-específicos, envolvidos na virulência e colonização, podem simplificar as associações entre a resposta imunológica e o desafio de infecção por SM.

Até o momento, poucos estudos investigaram o padrão de resposta imune a SM em crianças de baixa faixa etária, durante sua aquisição inicial (Camling e Köhler, 1987, Smith *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1999), considerada como a fase ideal para programas de controle de infecção por SM (Caufield *et al.*, 1993; Russel *et al.*, 1999). Os estudos nesta área foram realizados em populações com baixos índices de cárie e baixa frequência de infecção por SM e sugerem que as crianças somente desenvolvem um padrão mais complexo de resposta imune adaptativa a Ags de SM (definido pela diversidade de antígenos reconhecidos por IgA salivar), a partir dos 2 anos de idade, quando os níveis destas bactérias são detectáveis na cavidade bucal (Smith *et al.*, 1998, Cole *et al.*, 1999).

Esta baixa complexidade de resposta a SM, no primeiro ano de vida, não parece ser decorrente de deficiências na maturação do sistema imunológico das crianças estudadas, uma vez que, os padrões de IgA específica a antígenos de *Streptococcus mitis* biovar 1, um colonizador primário da cavidade bucal, revelaram alto grau de complexidade (Smith *et al.*, 1998). Diferentemente, nossos resultados indicaram que padrões de alta complexidade e de alta intensidade a Ags de SM podem ser detectados em crianças de apenas 1 ano de idade, mesmo que estes microrganismos se encontrem em níveis baixos e/ou transitórios. A complexidade da resposta a Ags de SM detectada no presente estudo não foi influenciada pelas concentrações de IgA salivar nos pares de crianças analisadas, uma vez que, os pares apresentavam níveis semelhantes de IgA total. Além disto, diversas crianças com maiores concentrações de IgA apresentaram resposta semelhante ou menos intensa a SM do que crianças com baixa concentração desta imunoglobulina na saliva. Assim, os dados sobre o padrão de especificidade de IgA salivar a Ags de SM revelaram que, mais importante que os níveis totais de IgA, são os padrões de especificidade destes anticorpos. Estudos prévios indicaram que indivíduos adultos, não infectados por SM, apresentaram maior grau de complexidade de IgA produzida (maior diversidade de Ags reconhecidos) do que indivíduos altamente colonizados por estas bactérias e cárie-ativos (Camling & Kohler, 1987; Bratthall *et al.*, 1997). Entretanto, não foi determinado, nestes estudos, um padrão de resposta específico associado à susceptibilidade à infecção por SM e/ou ao desenvolvimento da cárie dentária. A interferência de inúmeros fatores de influência na colonização por SM e nos níveis de IgA salivar dificultou a comparação entre estudos.

No presente estudo, utilizou-se de um método de imuno-deteção quimioluminescente que é reconhecidamente mais sensível do que outros métodos

colorimétricos aplicados nos estudos anteriores, o que pode ter facilitado a identificação de padrões de maior intensidade e complexidade. Entretanto, os ensaios realizados com salivas coletadas de adultos com níveis variáveis de SM demonstraram que a resposta a Ags de SM em adultos apresentou uma complexidade de resposta a Ags de SM comparáveis ou até mesmo menos intensas, do que algumas respostas observadas entre as crianças estudadas (Figura 10).

Diversos estudos em modelos animais demonstraram que a indução de Acs contra Ags de superfícies de SM envolvidos na virulência (AgI/II, Gtfs e GbpBs) foi capaz de proteger contra a cárie dentária (Bowen *et al.*, 1991; Jespersgaard *et al.*, 1999; Smith & Taubman, 1997; Tsuda *et al.*, 2000, Hajjishengallis & Michalek, 1999; Koga *et al.*, 2002). Entretanto, não se sabe ainda, se resposta específica a estes Ags pode ser eficientemente induzida em crianças antes e durante a janela de infectividade de SM e se as respostas específicas podem interferir na infecção por SM ou na patogênese destes microrganismos em humanos. Nossos dados mostraram que uma alta intensidade e complexidade do padrão de resposta de IgA, a Ags de SM, foi naturalmente alcançada antes do primeiro ano de vida (Figura 9, Tabela 3), mesmo em crianças não colonizadas por SM. Estudos anteriores em populações menos expostas à SM, também demonstraram níveis razoáveis de IgA específicos a Ags de SM antes da detecção destes microrganismos na cavidade bucal (Smith *et al.*, 1998). Estes dados indicam que há um grande potencial de indução de resposta de IgA em crianças jovens, antes do estabelecimento de SM na cavidade bucal.

Uma importante descoberta deste estudo, através da comparação das crianças infectadas e não infectadas, foi que o grau de infecção inicial por SM não foi associado à intensidade e complexidade de resposta, mas sim, com a especificidade dos anticorpos IgA

presentes na saliva a antígenos relevantes no estabelecimento do SM no biofilme dentário (Tabela 2). Além disto, os padrões de IgA reativos para Ags de SM demonstraram intensidades comparáveis às reações a extratos de antígenos de *Streptococcus mitis*, um colonizador primário da cavidade oral. Estes achados diferiram drasticamente de estudos prévios realizados em crianças, entre as quais, a aquisição inicial de SM ocorreu em idade média 28 meses (Smith *et al.*, 1998). No estudo de Smith *et al.* (1998), os níveis de IgA reativo a SM alcançaram alto grau de complexidade (no mínimo 6 bandas reativas distintas) somente aos 28 a 34 meses de idade, enquanto que a resposta aos Ags de *S. mitis* alcançou padrões de complexidade em idades mais precoces (13 a 23 meses), como no presente estudo. As variações de padrões de IgA reativos a Ags de SM e de *S. mitis* entre o estudo presente e o anterior, são compatíveis com os padrões de infecção inicial por SM em que uma exposição antigênica precoce a SM poderia refletir na intensidade da resposta de IgA a este microrganismo. Além das diferenças populacionais, ambos os estudos tem indicado que um considerável grau de complexidade de IgA reativo a Ags de SM, incluindo Ag I/II, GTF e GbpB, são identificados em crianças sem níveis detectáveis de infecção.

O presente estudo fornece dados inéditos indicando que a resposta específica à GbpB parece apresentar função muito importante na susceptibilidade à infecção por SM. Dentre os 21 pares de crianças analisadas, verificou-se que apenas 38,1% das crianças infectadas precocemente por SM respondiam a este Ag, enquanto que a grande maioria das crianças não-infectadas (76,8%) apresentavam uma resposta intensa à GbpB entre as fases T0 e T6 (Tabelas 2 e 3). Em várias crianças, o nível de anticorpos IgA-reativos a GbpB representou mais de 50% da resposta total de IgA aos antígenos de SM (Tabela 2), um perfil que foi mais freqüentemente detectado em crianças não infectadas pelo SM.

A GbpB foi previamente descrita como uma proteína imunodominante em crianças de 28 a 51 meses de idade (Smith *et al.*, 1998) e em adultos (Smith *et al.*, 1994) nos Estados Unidos e em adultos de Taiwan (aonde é referida como “*secreted antigen A*”) (Chia *et al.*, 2001). Vários polimorfismos têm sido descritos em GbpB (Mattos-Graner *et al.*, 2001b) tão bem como nos genes que codificam as GTFs (Mattos-Graner *et al.*, 2004). Estes polimorfismos poderiam refletir variações antigênicas, influenciando na capacidade de infecção por genótipos distintos de SM. Entretanto, não foi detectado, no presente estudo, variações significativas entre os padrões de reatividade de IgA entre genótipos distintos (Figura 11). Até o momento, nenhum homólogo de GbpB foi identificado em espécies comensais sequenciadas da cavidade oral (por exemplo, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. mitis* ou *S. sobrinus*). Por outro lado, homólogos de GbpB foram identificados em vários patógenos Gram positivos: *S. pneumoniae*, estreptococos do grupo B e *Enterococcus faecium* (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Seria, portanto interessante, analisar como a resposta a GbpB poderia interferir na infecção por estes outros patógenos. Crianças de populações de baixa exposição a SM apresentaram IgA específica para Gtfs purificadas de SM (Gahnberg *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1998). Diferentemente da GbpB, vários estreptococos comensais da cavidade oral, produzem isotipos de Gtfs com graus variáveis de homologia às três Gtfs produzidas por SM (GtfB, GtfC e GtfD) (Banas & Vickerman, 2003). Diferenças nos níveis de anticorpos contra as Gtfs de *S. sanguinis* e SM indicaram, no entanto, que não houve reação cruzada entre anticorpos Gtf-específicos entre estas duas espécies (Gahnberg *et al.*, 1985). Noventa por cento das 42 crianças avaliadas no presente estudo apresentaram IgA reativo para Gtfs de SM. Não houve relação entre a resposta a Gtfs e infecção por SM. Vários anticorpos Gtf-específicos poderiam ser reativos com

epítomos irrelevantes para as atividades enzimáticas. Foi demonstrado que epítomos funcionalmente relevantes das Gtfs são pobremente reconhecidos por IgA salivar naturalmente produzida em adultos (Smith *et al.*, 1997). Os Ag I/II foram também freqüentemente reconhecidos por anticorpos IgA salivares na nossa população em estudo, a despeito da presença da infecção. Alguns epítomos de Ag I/II apresentam reação cruzada com domínios de IgG humana (Koga *et al.*, 2002). Além disto, várias espécies comensais como *S. sanguinis*, *S. mitis* e *S. oralis* apresentam antígenos da família AgI/II, com homologias variando de 57 a 73% de identidade com o Ag I/II de SM (Koga *et al.*, 2002).

Associações entre, a especificidade de anticorpos IgA e a aquisição inicial de diversos patógenos, sugerem que o sistema imune de mucosas é capaz de modular a persistência de patógenos nas mucosas nasofaríngeas. Por exemplo, um pico na resposta a um Ag potencialmente aplicado em vacinas contra *Haemophilus influenzae*, a proteína de membrana externa (OMP) P6, foi detectado em idade precoce (1 a 24 meses) entre crianças que apresentavam curta persistência de colonização por *H. influenzae*, enquanto que a fraca resposta a este Ag foi observada em crianças colonizadas por maior diversidade de cepas desta bactéria, por períodos mais longos (Yamanaka e Faden, 1993; Faden *et al.*, 1994; Faden *et al.*, 1995). A persistência de colonização recorrente por cepas de *H. influenzae* em crianças susceptíveis à otite foi também associada à fraca resposta imune local ao antígeno OMP P6 (Yamanaka e Faden, 1993).

6.4. Análise da evolução de resposta de anticorpos IgA salivares a Ags de SM e *S. mitis*.

A análise da evolução do padrão de resposta imune de mucosas, durante as fases finais do estudo epidemiológico prospectivo (T12 e T18) mostrou que houve uma diminuição da intensidade e complexidade de resposta de IgA aos extratos de SM e de *S. mitis* independentemente dos graus de infecção. Este decréscimo da resposta específica a SM foi independente dos níveis de IgA salivares, uma vez que, estes níveis aumentaram sucessivamente com o avanço da idade (Figura 8). A diferença entre a presença ou não de IgA contra Ags de virulência de SM, sofreu redução com o aumento da idade (Figura 14 A-B), o que pode ter sido consequência da redução total de reatividade a diversos Ags de SM (Figura 14C).

O período de maior desafio de infecção ocorreu em T6, em que as crianças do subgrupo de infectadas albergavam em média de 45 ufc/área. Interessantemente, neste mesmo período (T6), as 8 crianças do subgrupo não infectado por SM apresentaram um pico de intensidade de resposta de IgA contra Ags totais de SM e também contra AgI/II e GbpB (Figura 14 e 15), o que não foi observado entre as crianças pertencentes ao subgrupo de infectados (n=8). A intensidade de resposta de IgA ao Ag I/II e antígenos totais de SM ocorreu sofreu aumento até a fase T6, enquanto que a intensidade de resposta contra a GbpB aumentou até T12. As diferenças significativas de resposta à GbpB entre os grupos, coincidente com a fase de maior desafio a infecção indicam que a especificidade de anticorpos IgA produzidos durante as fases iniciais de infecção por SM pode modular a colonização por estes microrganismos. As Figuras 14 e 15 evidenciam este aspecto. Na Figura 15 observa-se diferenças significativas entre as intensidades médias de reação entre

anticorpos salivares IgA e GbpB em T6, entre os 8 pares de crianças infectadas ou não com SM. As crianças não infectadas, responderam mais intensamente a este antígeno do que crianças infectadas pelo SM. Mesmo depois da exclusão de 13 pares (uma vez que continham crianças que saíram do estudo ou não sustentaram a condição de infecção), as crianças não colonizadas por SM, durante todo o estudo prospectivo, foram as que responderam mais freqüentemente à GbpB em T0 e T6, quando comparadas às crianças infectadas. Estas diferenças foram estatisticamente significantes (Figura 15).

Os dados deste estudo prospectivo indicam diversos caminhos para o estudo dos fatores que influenciariam nos padrões de resposta a Ags de SM, e possivelmente na susceptibilidade à infecção por SM. As razões para os diferentes padrões de resposta inicial à GbpB nas crianças analisadas precisam ser determinadas. Uma das hipóteses é que haplótipos distintos de MHC classe II estejam relacionados a variações na apresentação de epítomos de relevância funcional a linfócitos T auxiliares. Através da análise de bioinformática, foram identificados diversos peptídeos de alta afinidade a diversos alelos MHC de classe II (Smith *et al.*, 2003a).

6.5. Análise do padrão de resposta de anticorpos IgA salivares aos peptídeos sintéticos da GbpB.

As moléculas MHC II são expressas por células apresentadoras de antígeno (CAA) especializadas, incluindo os macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. A apresentação de peptídeos distintos, em complexo com MHC II, pode ativar diferentes clones de linfócitos T auxiliares e linfócitos B.

Estudos em colaboração com o Dr. Daniel J. Smith nos permitiram rastrear a resposta de IgA nas amostras salivares contra seis peptídeos sintéticos específicos da proteína GbpB, os quais haviam demonstrado boa imunogenicidade e função protetora em modelos de cárie experimental em ratos (Smith *et al.*, 2003a; Smith *et al.*, 2005). Através da tecnologia de Luminex, disponível no The Forsyth Institute, Boston, MA, E.U.A., estes ensaios puderam ser realizados com as amostras coletadas das crianças pertencentes a 19 pares (infectados e não infectados) selecionadas em T0 e T6.

As seqüências de peptídeos testadas foram selecionadas com base no potencial destes peptídeos de funcionar como um ligante do MHC classe II (Smith *et al.* 2003a). Assim, utilizando-se um sistema de bioinformática, puderam-se prever o grau relativo de ligação de um dado alelo de MHC classe II, com a seqüência da GbpB com comprimento de 10 ou 20 aminoácidos. Foram encontradas várias regiões dentro da seqüência protéica da GbpB. Dentre estas regiões, estavam seis seqüências denominadas de SYI, QGQ, VAR, ANY, QAA e SIG (Tabela 4).

Estudos de Mattos-Graner *et al.* (2001b) mostraram que das dezoito mutações no gene *gbpB*, encontradas entre 44 genótipos de SM, 9 promoveram alterações na seqüência protéica, sendo que 5 destas, resultaram em trocas por resíduos de diferentes classes. A maior parte, dos polimorfismos protéicos, estavam restritos à porção central, da seqüência primária da GbpB (Mattos-Graner *et al.*, 2001b) (Figura 3). Interessantemente, dois dos peptídeos testados (QGQ e VAR), faziam parte de um zíper de leucina (resíduos 65 a 93) próximo à parte amino-terminal (Figura 3) e esta região pode estar envolvida na interação da GbpB com outras proteínas (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Os peptídeos ANY, SIG QGQ, VAR e SYI estavam localizados em áreas conservadas da seqüência da proteína

(Figura 3), visto que nenhuma mutação foi detectada em suas regiões (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). No entanto, o peptídeo QAA estava localizado em uma área central da sequência protéica (resíduos 252 a 270), a qual contém diversos polimorfismos (Mattos-Graner *et al.*, 2001b) (Figura 3).

Ao contrário do que foi observado nos ensaios de western blot, em que a resposta contra a GbpB nativa se diferenciou entre crianças infectadas e não infectadas, nenhum peptídeo mostrou ser mais reativo em salivas de crianças não infectadas, em comparação com os respectivos pares. Apesar disto, a grande maioria dos peptídeos reagiram com IgA presentes nas amostras salivares das crianças. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as freqüências de resposta de IgA contra os seis peptídeos sintéticos testados entre os 19 pares de crianças. Isto pode ter ocorrido porque os epítomos altamente imunogênicos nas crianças não infectadas e que resultaram em uma resposta mais freqüente contra a GbpB nativa, não corresponderam aos peptídeos testados. Uma outra hipótese pertinente é a de que, crianças não infectadas por SM respondem simultaneamente a um conjunto maior de peptídeos, o que também representaria uma resposta mais intensa à GbpB.

A análise da hidrofobicidade, de cada um destes peptídeos, pôde contribuir para a o entendimento da possível posição na GbpB nativa, uma vez que peptídeos mais hidrofóbicos tendem a ficar mais internamente na conformação da proteína, enquanto que os peptídeos hidrofílicos, estariam localizados nas regiões expostas da proteína, o que resultaria em peptídeos mais acessíveis ao reconhecimento por anticorpos IgA. Os peptídeos VAR e SYI possuem 64 e 55% de resíduos hidrofílicos respectivamente, enquanto que QGQ, QAA, SIG e ANY possuem 48, 47, 35 e 30% de resíduos hidrofílicos

respectivamente. Injeções locais de QGQ e SYI em ratos induziram níveis significantes de IgG específico a estes Ags (Smith *et al.*, 2003) em 67% e 100% dos animais imunizados com estes respectivos Ags, mostrando que esta elevada resposta de anticorpos suporta a habilidade do recurso de bioinformática na identificação de peptídeos imunogênicos. Além disto, os anticorpos IgG específicos aos peptídeos sintéticos reagiram com epítomos nativos quando em contato com a proteína GbpB, mostrando que estes peptídeos estão expostos ou próximos da superfície da proteína. Interessantemente, uma minoria, dos ratos imunizados com a GbpB, demonstrou significante reatividade de IgG a estes peptídeos construídos (Smith *et al.*, 2003), o que é compatível com os resultados do presente estudo.

Entre as crianças estudadas, o peptídeo QAA apresentou a segunda maior intensidade de resposta de IgA (Tabela 4; Figura 17), apesar de não ser mais hidrofóbico e de estar localizado em uma área não conservada da GbpB (Figura 3). O peptídeo SYI foi o mais imunogênico nas amostras salivares de crianças brasileiras (independentemente do grau de infecção). Este peptídeo foi efetivo no controle de cárie experimental em ratos (Smith *et al.*, 2003a). Assim, este peptídeo poderia ser um forte candidato para uma vacina de subunidades peptídicas da GbpB para aplicação em humanos, uma vez que, está localizado em uma área conservada da GbpB. Os peptídeos QGQ, VAR e SIG também foram comumente reconhecidos por IgA das salivas de crianças (Tabela 4, Figura 17) e estão localizados em áreas conservadas na GbpB (Figura 3). A associação destes peptídeos, de maior relevância, poderia ser uma alternativa efetiva para a construção de vacinas di ou multiepitópicas (Taubman *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2005).

Diversos estudos serão necessários para investigar as razões para as grandes diferenças na resposta a GbpB entre as crianças estudadas. O rastreamento, de outros

peptídeos, que ainda não foram testados, poderia auxiliar neste aspecto. Comparações entre os padrões de peptídeos reconhecidos por crianças de diferentes populações poderiam ainda, auxiliar no delineamento de vacinas de subunidades para utilização em seres humanos.

7. CONCLUSÕES.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que, na população estudada:

- Uma[RN1][RN2] forte resposta imunológica aos antígenos de SM e *S. mitis* ocorre em crianças durante o primeiro ano de vida;
- Há aumento dos níveis de IgA e IgA1 e baixos níveis de IgM com o aumento da idade, o que pode refletir a maturação fisiológica do sistema imune de mucosas em crianças;
- Anticorpos IgA específicos para AgI/II e Gtf são freqüentemente detectados tanto na saliva de crianças precocemente colonizadas, como nas não colonizadas por SM;
- GbpB é uma proteína imunodominante em crianças com pouca idade, sendo que anticorpos IgA reativos contra GbpB corresponderam a 50% ou mais de todos os anticorpos IgA reativos com antígenos de SM;
- Anticorpos IgA específicos a GbpB são significativamente mais freqüentes nas crianças não colonizadas do que nas colonizadas precocemente por SM;
- Crianças precocemente colonizadas com SM raramente apresentaram baixos títulos de IgA específico para a GbpB na saliva durante a fase inicial de aquisição de SM;
- O pico de produção de anticorpos IgA contra antígenos de SM ocorreu quando as crianças estão na faixa etária de 11 a 19 meses;
- Dentre os peptídeos derivados de GbpB testados, o SYI é o mais imunogênico independentemente da infecção por SM;
- Não há diferenças significativas na produção de IgA reativos contra todos os seis peptídeos sintéticos da GbpB testados, entre as crianças infectadas ou não por SM.

Referências

1. ABO, H.; MATSUMURA, T.; KODAMA, T.; OHTA, H.; FUKUI, K.; KATO, K.; KAGAWA, H. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). J Bacteriol 173:989-996; 1991
2. AIRES, C.P.; TABCHOURY, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; KOO, H.; CURY, J.A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. Caries Res 40:28-32, 2006
3. AJDIC, D.; MCSHAN, W.M.; MCLAUGHLIN, R.E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M.B.; *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl Acad Sci USA 99:14434–14439, 2002
4. ALALUUSUA, S.; RENKONEN, O.V. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. Scand J Dent Res 91:453-457, 1993.
5. BANAS, J.A.; RUSSELL, R.R.; FERRETTI, J.J. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. Infect Immun 58: 667-673, 1990.
6. BANAS, J.A.; VICKERMAN, M.M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med 14:89-99, 2003
7. BECKER, M.R.; PASTER, B.J.; LEYS, E.J.; MOESCHBERGER, M.L.; KENYON, S.G.; GALVIN, J.L.; BOCHES, S.K.; DEWHIRST, F.E.; GRIFFEN, A.L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol. 40:1001-1009, 2002.
8. BERKOWITZ, R.J.; TURNER, J.; GREEN, P. Primary oral infaction of infants with *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 25:221-224, 1980.

9. BLEIWEIS, A.S; OYSTON, P.C; BRADY, L.J. Molecular; immunological and functional characterization of the major surface adhesin of *Streptococcus mutans*. Adv Exp Med Biol 327:229-241, 1992.
10. BOWEN, W. H.; SCHILLING, K., GIERTSEN, E.; PEARSON, S.; LEE, S.F.; BLEIWEIS, A.; BEEMAN, D. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. Infect Immun 59:4606-4609, 1991.
11. BRADY, L.J; PIACENTINI, D.A; CROWLEY, P.J.; OYSTON, P.C; BLEIWEIS, A.S. Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. Infect Immun 60:1008-1017, 1992.
12. BRADY, L.J; PIACENTINI, D.A; CROWLEY, P.J.; BLEIWEIS, A.S. Identification of monoclonal antibody-binding domains within antigen P1 of *Streptococcus mutans* and cross-reactivity with related surface antigens of oral streptococci. Infect Immun 59:4425-4435, 1991.
13. BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I.N.; HARALDSEN, G.; JAHNSEN, F.L. Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. Dev Biol Stand 92:93-108, 1998.
14. BRANDTZAEG, P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. APMIS 103: 1-19, 1995
15. BRANDTZAEG, P. Overview of the mucosal immune system. Curr Top Microbiol Immunol 146:13-25, 1989.
16. BRANDTZAEG, P. Mucosal immunology--with special reference to specific immune defense of the upper respiratory tract. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 50:225-235, 1988.
17. BRANDZAEG, P. Overview of the mucosal immune system with special emphasis on its relation to dental caries. Proc Finn Dent Soc 79:71-84, 1984.

18. BRANDTZAEG, P.; GUY-GRAND, D.; GRISCELLI, C. Intestinal salivary, and tonsillar IgA and J-chain production in a patient with severe deficiency of serum IgA. Scand J Immunol 13:313-325, 1981.
19. BRATTHALL, D.; SERINIRACH, R.; HAMBERG, K.; WIDERSTROM, L. Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans streptococci. Oral Microbiol Immunol 12:212-218, 1997.
20. BRATTHALL, D. Mutans streptococci—dental, oral and global aspects. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 9: 4-12, 1991.
21. BRATTHALL, D.; KOHLER, B. *Streptococcus mutans* serotypes: some aspects of their identification; distribution; antigenic shifts; and relationship to caries. J Dent Res 55:15-21, 1976.
22. BROWN, T.A.; MESTECKY, J. Immunoglobulin A subclass distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens. Infect Immun 49:459-462, 1985.
23. BURGIO, G.R.; LANZAVECCHIA, A.; PLEBANI, A.; JAYAKAR, S.; UGAZIO, A.G. Ontogeny of secretory immunity: levels of secretory IgA and natural antibodies in saliva. Pediatr Res 14:1111-1114, 1980.
24. Burne, R.A. Oral streptococci, products of their environment. J Dent Res 77:445-452, 1998.
25. CAMLING, E.; KOHLER, B. Infection with the bacterium *Streptococcus mutans* and salivary IgA antibodies in mothers and their children. Arch Oral Biol 32:817-823, 1987.
26. CARLSSON, J.; GRAHNEN, H.; JONSSON, G. Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. Caries Res 9:333-339, 1975.

27. CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 72:37-45, 1993.
28. CAUFIELD, P. W.; DASANAYAKE, A. P.; LI, Y.; PAN, Y.; HSU, J.; HARDIN, J.M. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun* 68:4018-4023, 2000.
29. CHIA, J.S.; CHANG, L.Y.; SHUN, C.T; CHANG, Y.Y.; TSAY, Y.G.; CHEN, J.Y. A 60-kilodalton immunodominant glycoprotein is essential for cell wall integrity and the maintenance of cell shape in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 69:6987-6998, 2001.
30. CHILDERS; N.K.; GREENLEAF, C.; LI, F.; DASANAYAKE, A.P.; POWELL, W.D.; MICHALEK, S.M. Effect of age on immunoglobulin A subclass distribution in human parotid saliva. *Oral Microbiol Immunol* 18:298-301, 2003.
31. CHILDERS, N.K.; TONG, G.; LI, F.; DASANAYAKE, A.P.; KIRK, K.; MICHALEK, S.M. Humans immunized with *Streptococcus mutans* antigens by mucosal routes. *J Dent Res* 81:48-52, 2002.
32. CHILDERS; N.K.; TONG, G.; MITCHELL, S.; KIRK, K.; RUSSELL, R.W.; MICHALEK, S.M. A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a *Streptococcus mutans* antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses. *Infect Immun* 67:618-623, 1999.
33. CHILDERS; N.K.; ZHANG, S.S.; MICHALEK, S.M. Oral immunization of humans with dehydrated liposomes containing *Streptococcus mutans* glucosyltransferase induces salivary immunoglobulin A2 antibody responses. *Oral Microbiol Immunol* 9:146-153, 1994.
34. CLARKE, J.K. On the bacteria factor in the etiology of dental caries. *J Exper Path* 5: 141-147, 1924.
35. COLE, M.F.; BRYAN, S.; EVANS, M.K.; PEARCE, C.L.; SHERIDAN, M.J.; SUR, P.A.; WIENTZEN, R.L.; BOWDEN, G.H.W. Humoral immunity to

- commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. Infect Immun 67:1878-1886, 1999.
36. CRAGO, S.S; KULHAVY, R.; PRINCE, S.J.; MESTECKY, J. Secretory component of epithelial cells is a surface receptor for polymeric immunoglobulins. J Exp Med 147:1832-1837, 1978.
 37. CROWLEY, P.J.; BRADY, L.J.; PIACENTINI, D.A.; BLEIWEIS, A.S. Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 61:1547-1552, 1993.
 38. DELACROIX, D.L; DIVE, C.; RAMBAUD, J.C.; VAERMAN, J.P. IgA subclasses in various secretions and in serum. Immunol 47:383-385, 1982.
 39. DEMUTH, D.R.; DAVIS, C.A.; CORNER, A.M.; LAMONT, R.J.; LEBOY, P.S.; MALAMUD, D. Cloning and expression of a *Streptococcus sanguis* surface antigen that interacts with a human salivary agglutinin. Infect Immun 56:2484-2490, 1988.
 40. DEMUTH, D.R.; LAMMEY, M.S.; HUCK, M.; LALLY, E.T.; MALAMUD, D. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. Microb Pathog 9:199-211, 1990.
 41. DICKINSON, B.L.; CLEMENTS, J.D. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. Infect Immun 63:1617-1623, 1995.
 42. DUNCAN, M.J. Genomics of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 14:175-187, 2003.
 43. FADEN, H.; DUFFY, L.; WILLIAMS, A.; KRYSTOFIK, D.A.; WOLF, J. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. J Infect Dis 172:132-135, 1995.

44. FADEN; H.; HARABUCHI, Y.; HONG, J.J. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media. *J Infect Dis* 169:1312-1317, 1994.
45. FERNANDES; F.R.; NAGAO, A.T.; MAYER, M.P.; ZELANTE, F.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Compensatory levels of salivary IgM anti-*Streptococcus mutans* antibodies in IgA-deficient patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 5:151-155, 1995.
46. FITZGERALD, R.J.; KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* 61:9-19, 1960.
47. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol* 1:304-320, 1960.
48. FITZSIMMONS, S.P.; EVANS, M.K.; PEARCE, C.L.; SHERIDAN, M.J.; WIENTZEN, R.; COLE, M.F. Immunoglobulin A subclasses in infants' saliva and in saliva and milk from their mothers. *J Pediatr* 124:566-573, 1994.
49. FRANDSEN, E.V.; THEILADE, E.; ELLEGAARD, B.; KILIAN, M. Proportions and identity of IgA1-degrading bacteria in periodontal pockets from patients with juvenile and rapidly progressive periodontitis. *J Periodontal Res* 21:613-623, 1986.
50. FRANDSEN, E.V.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 6:129-133, 1991.
51. GAHNBERG, L.; SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L. Salivary-IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. *Arch Oral Biol* 30:551-556, 1989.
52. GLEESON, M; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L. Modifiers of the human mucosal immune system. *Immun Cell Biol* 73: 397-404, 1995.

53. GLEESON, M; DOBSON, A.J.; FIRMAN, D.W.; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L.; WLODARCZYK, J.H.; HENSLEY, M.J. The variability of immunoglobulins and albumin in salivary secretions of children. *Scand J Immunol* 33: 533-541, 1991.
54. GLEESON, M; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L.; WLODARCZYK, J.H.; DOBSON, A.J.; HENSLEY, M.J. The development of IgA-specific antibodies to *Escherichia coli* O antigen in children. *Scand J Immunol* 26: 639-643, 1987.
55. GLEESON, M; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L.; HENSLEY, M.J.; DOBSON, A.J.; FIRMAN, D.W. Breast feeding conditions a differential developmental pattern of mucosal immunity. *Clin Exp Immunol* 66: 216-222, 1986.
56. GLEESON, M; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L.; HUSBAND, A.J.; HENSLEY, M.J.; LEEDER, S.R. Ontogeny of the secretory immune system in man. *Aust N Z J Med* 12: 255-258, 1982.
57. HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S.M. Current status of mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol Immunol* 14:1-20, 1999.
58. HAJISHENGALLIS, G.; NIKOLOVA, E.; RUSSELL, M.W. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (S-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA1 protease cleavage. *Infect Immun* 60: 5057-5064, 1992.
59. HAMADA, S.; HORIKOSHI, T.; MINAMI, T.; KAWABATA, S.; HIRAOKA, J.; FUJIWARA, T.; OOSHIMA, T. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 59: 4161-4167, 1991.
60. HANADA, N.; KURAMITSU, H.K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfD gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect Immun* 57: 2079-2085, 1989.
61. HANADA, N.; KURAMITSU, H.K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect Immun* 56: 1999-2005, 1988.

62. HASTY, D.L.; OFEK, I.; COURTNEY, H.S.; DOYLE, R.J. Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* 60: 2147-2152, 1992.
63. HAZLETT, K.R.; MAZURKIEWICZ, J.E.; BANAS, J.A. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the *gtfB* and *gtfC* genes. *Infect Immun* 67: 3909-3914, 1999.
64. HAZLETT, K.R.; MICHALEK, S.M.; BANAS, J.A. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes *in vivo* accumulation of recombination between the glucosyltransferase B and C genes. *Infect Immun* 66: 2180-2185, 1998.
65. HAWORTH, J.C.; DILLING, L. Concentration of gamma-A-globulin in serum; saliva, and nasopharyngeal secretions of infants and children. *J Lab Clin Med* 67: 922-933, 1966.
66. JENKINSON, H.F.; DEMUTH, D.R. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol* 23: 183-190, 1997.
67. JESPERSGAARD, C.; HAJISHENGALLIS, G.; HUANG, Y.; RUSSELL, M.W.; SMITH, D.J.; MICHALEK, S.M. Protective immunity against *Streptococcus mutans* infection in mice after intranasal immunization with the glucan-binding region of *S. mutans* glucosyltransferase. *Infect Immun* 67: 6543-6549, 1999.
68. KATO, C.; KURAMITSU, H.K. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 60: 299-302, 1990.
69. KATZ, J.; HARMON, C.C.; BUCKNER, G.P.; RICHARDSON, G.J.; RUSSELL, M.W.; MICHALEK, S.M. Protective salivary immunoglobulin A responses against *Streptococcus mutans* infection after intranasal immunization with *S. mutans* antigen I/II coupled to the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun* 61: 1964-1971, 1993.

70. KELLY, C.G.; TODRYK, S.; KENDAL, H.L.; MUNRO, G.H.; LEHNER, T. T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II Infect Immun 63: 3649-3658, 1995.
71. KELLY, C.G.; EVANS, P.; BERGMEIER, L.; LEE, S.F.; PROGULSKE-FOX, A.; HARRIS, A.C.; AITKEN, A.; BLEIWEIS, A.S.; LEHNER, T. Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. FEBS Lett 258:127-132, 1989.
72. KERR, M.A. The structure and function of human IgA. Biochem J 271: 285-296, 1990.
73. KILIAN, M.; BRATTHALL, D. Imunologia da cárie dentária. In: THYLSTUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica. 2.ed. São Paulo: Santos; 355-366, 1995.
74. KILIAN, M.; HOLMGREN, K. Ecology and nature of immunoglobulin A1 protease-producing streptococci in the human oral cavity and pharynx. Infect Immun 31:868-873, 1981.
75. KILIAN, M. Degradation of immunoglobulins A1, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens. Infect Immun 34: 757-765, 1981
76. KLEIN, M.I.; FLORIO, F.M.; PEREIRA, A.C.; HOFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol 42: 4620-4626, 2004.
77. KOGA, T.; OHO, T.; SHIMAZAKI, Y.; NAKANO, Y. Immunization against dental caries. Vaccine 20: 2027-2044, 2002
78. KOGA, T.; OKAHASHI, N.; TAKAHASHI, I.; KANAMOTO, T.; ASAKAWA, H.; IWAKI, M. Surface hydrophobicity, adherence and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. Infect Immun 58: 289-296, 1990.

79. KOHLER; B.; ANDREEN, I. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. Arch Oral Biol 39: 907-911, 1994.
80. KOHLER; B.; ANDREEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci; the higher the caries prevalence at 4 years of age. Oral Microbiol Immunol 3: 14-17, 1988.
81. KOHLER; B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. J Clin Microbiol 9: 584-588, 1979.
82. KRASSE, B. Human streptococci and experimental caries in hamsters. Arch Oral Biol 11: 429-436, 1966.
83. KURAMITSU, H.K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med 4: 159-176, 1993.
84. KURAMITSU, H.K. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. Curr Issues Mol Biol 3: 35-36, 2001.
85. LEHNER, T.; RUSSELL, M.W.; WILTON, J.M.; CHALLACOMBE, S.J.; SCULLY, C.M.; HAWKES, J.E. Passive immunization with antisera to *Streptococcus mutans* in the prevention of caries in rhesus monkeys. Adv Exp Med Biol 107: 303-315, 1978.
86. LEHNER, T.; RUSSELL, M.W.; CALDWELL, J.; SMITH, R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. Infect Immun 34: 407-415, 1981.
87. LI, F.; MICHALEK, S.M.; DASANAYAKE, A.P.; LI, Y.; KIRK, K.; CHILDERS, N.K. Intranasal immunization of humans with *Streptococcus mutans* antigens. Oral Microbiol Immunol 18: 271-277, 2003.
88. LI, Y.; DASANAYAKE, A.P.; CAUFIELD, P.W.; ELLIOTT, R.R.; BUTTS, J.T. Characterization of maternal mutans streptococci transmission in an African American population. Dent Clin North Am 47: 87-101, 2003.

89. LI, Y.; CAUFIELD, P.W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 74:681-685, 1995.
90. LILJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 7:180-198, 1996.
91. LIS, M.; SHIROZA, T.; KURAMITSU, H.K. Role of C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl Environ Microbiol* 61:2040-2042, 1995.
92. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50:353-380, 1986.
93. LOVE, R.M.; MCMILLAN, M.D.; JENKINSON, H.F. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun* 65:5157-5164, 1997.
94. MA, J.K.; HIKMAT, B.Y.; WYCOFF, K.; VINE, N.D.; CHARGELEGUE, D.; YU, L.; HEIN, M.B.; LEHNER, T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 4:601-606, 1998.
95. MA, J.K.; KELLY, C.G.; MUNRO, G.; WHILEY, R.A.; LEHNER, T. Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci. *Infect Immun* 59:2686-2694, 1991.
96. MA, J.K.; SMITH, R.; LEHNER, T. Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 55:1274-1278, 1987.
97. MA, Y.; LASSITER, M.O.; BANAS, J.A.; GALPERIN, M.Y.; TAYLOR, K.G.; DOYLE, R.J. Multiple glucan-binding proteins of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol* 178:1572-1577, 1996.
98. MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:71-109, 1998.

99. MATTOS-GRANER, R.O.; PORTER, K.A.; SMITH, D.J.; HOSOGI, Y.; DUNCAN, M.J. Functional analysis of glucan binding protein B from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 188:3813-3825, 2006.
100. MATTOS-GRANER; R. O.; NAPIMOGA, M.H.; FUKUSHIMA, K.; DUNCAN, M.J.; SMITH, D.J. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. J Clin Microbiol 42:4586-4592, 2004
101. MATTOS-GRANER; R. O.; CORREA. M.S.; LATORRE, M.R.; PERES, R.C.; MAYER, M.P. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. J Public Health Dent 61:161-167, 2001a.
102. MATTOS-GRANER; R. O.; JIN, S.; KING, W.F.; CHEN, T.; SMITH, D.J.; DUNCAN, M.J. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infect Immun 69:6931-6941, 2001b
103. MATTOS-GRANER; R.O.; LI, Y.; CAUFIELD, P.W.; DUNCAN, M.J.; SMITH, D.J. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 39:2313-2316, 2001c.
104. MATTOS-GRANER, R.O.; ZELANTE, F.; LINE, R.C.; MAYER, M.P. Association between caries prevalence and clinical; microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. Caries Res 32:319-323, 1998.
105. MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M.T.; ELDRIDGE, J.H.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine 10:75-88, 1992.
106. MELLANDER, L.; CARLSSON, B.; HANSON, L.A. Secretory IgA and IgM antibodies to *E. coli* O and poliovirus type I antigens occur in amniotic fluid, meconium and saliva from newborns. A neonatal immune response without

- antigenic exposure: a result of anti-idiotypic induction? Clin Exp Immunol 63:555-561, 1986.
107. MELLANDER, L.; CARLSSON, B.; JALIL, F.; SODERSTROM, T.; HANSON, L.A. Secretory IgA antibody response against *Escherichia coli* antigens in infants in relation to exposure. J Pediatr 107:430-433, 1985.
108. MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. J Am Chem Soc 85: 2149-2154, 1963.
109. MICHALEK, S.M.; KATZ, J.; CHILDERS, N.K.; MARTIN, M.; BALKOVETZ, D.F. Microbial/host interactions: mechanisms involved in host responses to microbial antigens. Immunol Res 26:223-234, 2002.
110. MICHALEK, S.M.; KATZ, J.; CHILDERS, N.K. A vaccine against dental caries: an overview. BioDrugs 15:501-8, 2001.
111. MICHALEK, S.M.; MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; ARNOLD, R.R.; BOZZO, L. Ingestion of *Streptococcus mutans* induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. Science 192:1238-1240, 1976.
112. MICHETTI, P.; MAHAN, M.J.; SLAUCH, J.M.; MEKALANOS, J.J.; NEUTRA, M.R. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 60:1786-1792, 1992.
113. MOISSET, A.; SCHATZ, N.; LEPOIVRE, Y.; AMADIO, S.; WACHSMANN, D.; SCHOLLER, M.; KLEIN, J.P. Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. Infect Immun 62:184-193, 1994.
114. MONCHOIS, V.; VIGNON, M.; RUSSELL, R.R. Mutagenesis of asp-569 of glucosyltransferase I glucansucrase modulates glucan and oligosaccharide synthesis. Appl Environ Microbiol 66:1923-1927, 2000.

115. MOOSER, G.; HEFTA, S.A.; PAXTON, R.J.; SHIVELY, J.E.; LEE, T.D. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* alpha-glucosyltransferases. J Biol Chem 266:8916-8922, 1991.
116. MOOSER, G.; WONG, C. Isolation of a glucan-binding domain of glucosyltransferase (1;6-alpha-glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. Infect Immun 56:880-884, 1988.
117. MUNRO, C.; MICHALEK, S.M.; MACRINA, F.L. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. Infect Immun 59:2316-2323, 1991.
118. MUNRO, G.H.; EVANS, P.; TODRYK, S.; BUCKETT, P.; KELLY, C.G.; LEHNER, T. A protein fragment of streptococcal cell surface antigen I/II which prevents adhesion of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 61:4590-4598, 1993.
119. NAGAO, A.T.; PILAGALLO, M.I.; PEREIRA, A.B. Quantitation of salivary, urinary and faecal sIgA in children living in different conditions of antigenic exposure. J Trop Pediatr 39:278-283, 1993.
120. NAKANO, K.; MATSUMURA, M.; KAWAGUCHI, M.; FUJIWARA, T.; SOBUE, S.; NAKAGAWA, I. Attenuation of glucan-binding protein C reduces the cariogenicity of *Streptococcus mutans*: analysis of strains isolated from human blood. J Dent Res 81: 376-79, 2002.
121. NAVARRE, W.W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev 63:174-229, 1999.
122. OKAHASHI, N.; SASAKAWA, C.; YOSHIKAWA, M.; HAMADA, S.; KOGA, T. Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*. Mol Microbiol 3:221-228, 1989.
123. PEACOCK, Z.S.; BARNES, L.A.; KING, W.F.; TRANTOLO, D.J.; WISE, D.L.; TAUBMAN, M.A.; SMITH, D.J. Influence of microparticle formulation on

- immunogenicity of SYI; a synthetic peptide derived from *Streptococcus mutans* GbpB. Oral Microbiol Immunol 20:60-64, 2005.
124. PEARCE, C.; BOWDEN, G.H.; EVANS, M.; FITZSIMMONS, S.P.; JOHNSON, J.; SHERIDAN, M.J.; WIENTZEN, R.; COLE, M.F. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. J Med Microbiol 42:67-72, 1995.
125. REINHOLDT, J.; KILIAN, M. Interference of IgA protease with the effect of secretory IgA on adherence of oral streptococci to saliva-coated hydroxyapatite. J Dent Res 66:492-497, 1987.
126. REINSCHIED, D.J.; GOTTSCHALK, B.; SCHUBERT, A.; EIKMANN, B.J.; CHHATWAL, G.S. Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. J Bacteriol 183:1175-1183, 2001.
127. RIGDEN, D.J.; JEDRZEJAS, M.J.; GALPERIN, M.Y. Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D;L-glutamate-specific amidohydrolases. Trends Biochem Sci 28:230-234, 2003.
128. ROITT I.M.; LEHNER, T. Immunology of oral diseases. 2.ed. Oxford: Blackwell; 1983. 442p.
129. RUSSELL, M.W.; CHILDERS, N.K.; MICHALEK, S.M.; SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. A Caries Vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. Caries Res 38:230-235, 2004.
130. RUSSELL, M.W.; HAJISHENGALLIS, G.; CHILDERS, N.K.; MICHALEK, S.M. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. Caries Res 33: 4-15, 1999.
131. RUSSELL, M.W.; BERGMEIER, L.A.; ZANDERS, E.D.; LEHNER, T. Protein antigens of *Streptococcus mutans*: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. Infect Immun 28:486-493, 1980.

132. RUSSELL, M.W.; LEHNER, T. Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. Arch Oral Biol 23:7-15, 1978.
133. RUSSELL, R.R.; COLEMAN, D.; DOUGAN, G. Expression of a gene for glucan-binding protein from *Streptococcus mutans* in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 131:295-299, 1985
134. RUSSELL, R.R. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. J Gen Microbiol 112:197-201, 1979.
135. SATO, Y.; YAMAMOTO, Y.; KIZAKI, H. Cloning and sequence analysis of the gbpC gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 65:668-675, 1997.
136. SCIOTTI, M.A.; YAMODO, I.; KLEIN, J.P.; OGIER, J.A. The N-terminal half part of the oral streptococcal antigen I/II contains two distinct binding domains. FEMS Microbiol Lett 153:439-445, 1997.
137. SEIDEL, B.M.; SCHULZE, B.; KIESS, W.; VOGTMANN, C.; BORTE, M. Determination of secretory IgA and albumin in saliva of newborn infants. Biol Neonate 78:186-190, 2000.
138. SHAH, D.S.; RUSSELL, R.R. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. Microbiology 6:1947-1956, 2004.
139. SHIROZA, T.; UEDA, S.; KURAMITSU, H.K. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 169:4263-4270, 1987.
140. SMITH, D.J.; KING, W.F.; RIVERO, J.; TAUBMAN, M.A. Immunological and protective effects of diepitopic subunit dental caries vaccines. Infect Immun 73:2797-804, 2005.
141. SMITH, D.J.; KING, W.F.; BARNES, L.A.; PEACOCK, Z.; TAUBMAN, M.A. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides

- associated with putative immunodominant regions of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein B. Infect Immun 71:1179-1184, 2003a.
142. SMITH, D.J.; LAM, A.; BARNES, L.A.; KING, W.F.; PEACOCK, Z.; WISE, D.L.; TRANTOLO, D.J.; TAUBMAN, M.A. Remote glucosyltransferase-microparticle vaccine delivery induces protective immunity in the oral cavity. Oral Microbiol Immunol 18:240-248, 2003b.
 143. SMITH, D.J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. Crit Rev Oral Biol Med 13: 335-349, 2002.
 144. SMITH; D.J.; KING, W.F.; GODISKA, R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. Infect Immun 69:3135-3142, 2001.
 145. SMITH, D.J.; TRANTOLO, D.J.; KING, W.F.; GUSEK, E.J.; FACKLER, P.H.; GRESSER, J.D.; DE SOUZA, V.L.; WISE, D.L. Induction of secretory immunity with bioadhesive poly (D;L-lactide-co-glycolide) microparticles containing *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase. Oral Microbiol Immunol 15:124-130, 2000.
 146. SMITH; D.J.; KING, W.F.; AKITA,H.; TAUBMAN, M.A. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. Oral Microbiol Immunol 13:278-285, 1998.
 147. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. Infect Immun 64:3069-3073, 1996.
 148. SMITH; D.J.; SHOUSHARI, B.; HESCHEL, R.L; KING, W.F.; TAUBMAN, M.A. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic subdomain of mutans group streptococcal glucosyltransferase. Infect.Immun 65:4424-4430, 1997.

149. SMITH, D.J.; AKITA, H.; KING, W.F.; TAUBMAN, M.A. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 62:2545-2552, 1994a.
150. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A.; KING, W.F.; EIDA, S.; POWELL, J.R.; EASTCOTT, J. Immunological characteristics of a synthetic peptide associated with a catalytic domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. Infect Immun 62:5470-5476, 1994b.
151. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A.; HOLMBERG, C.F.; EASTCOTT, J.; KING, W.F.; ALI-SALAAM, P. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. Infect Immun 61:2899-2905, 1993.
152. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. Emergence of immune competence in saliva. Crit Rev Oral Biol Med 4:335-341, 1993.
153. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. Crit Rev Oral Biol Med 3:109-133, 1992.
154. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of mutans streptococci. J Clin Immunol 10:273-281, 1990.
155. SMITH, D.J.; KING, W.F.; TAUBMAN, M.A. Isotype, subclass and molecular size of immunoglobulins in salivas from young infants. Clin Exp Immunol 76:97-102, 1989.
156. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L. Ontogeny and senescence of salivary immunity. J Dent Res 66:451-456, 1987.
157. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L. Effects of local immunization with glucosyltransferase on colonization of hamsters by *Streptococcus mutans*. Infect Immun 37:656-661, 1982.

158. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L. Local and systemic antibody response to oral administration of glucosyltransferase antigen complex. *Infect Immun* 28:441-450, 1980.
159. SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L. Effect of oral administration of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries. *Infect Immun* 26:82-89, 1979.
160. STEPHAN, R.M. Intra-oral hydrogen-ion concentration associated with dental caries activity. *J Dent Res* 23: 257–266, 1944.
161. STROBES, W.; JAMES, S.P. The mucosal immune system. *In*: STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLow, T.G. *Basic & Clinical Immunology*. 8.ed. Los Altos: Lange Medical Book; 541-555, 1984.
162. TAKAHASHI, I.; OKAHASHI, N.; MATSUSHITA, K.; TOKUDA, M.; KANAMOTO, T.; MUNEKATA, E.; RUSSELL, M.W.; KOGA, T. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. *J Immunol* 146:332-336, 1991.
163. TAM, J.P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5409-5413, 1988.
164. TANNER, A.C; MILGROM, P.M.; KENT, R.JR; MOKEEM, S.A.; PAGE, R.C.; LIAO, S.I.; RIEDY, C.A.; BRUSS, J.B. Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study. *Oral Microbiol Immunol* 17:379-387, 2002.
165. TANZER, J.M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A.M. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 65:1028-1037, 2001.
166. TAPPUNI, A.R.; CHALLACOMBE, S.J. Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predecidate and decidate children and adults. *J Dent Res* 72:31-36, 1993.

167. TAUBMAN, M.A.; SMITH, D.J. Effects of local immunization with glucosyltransferase fractions from *Streptococcus mutans* on dental caries in rats and hamsters. J Immunol 118:710-720, 1977.
168. TAUBMAN, M.A.; HOLMBERG, C.J.; SMITH, D.J. Diepitopic construct of functionally and epitopically complementary peptides enhances immunogenicity; reactivity with glucosyltransferase; and protection from dental caries. Infect Immun 69:4210-4216, 2001.
169. TENUTA, L.M.; LIMA, J.E.; CARDOSO, C.L.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. Pesqui Odontol Bras 17:326-331, 2003.
170. THRANE, P.S.; ROGNUM, T.O.; HUITFELDT, H.S.; BRANDTZAEG, P. The distribution of HLA-DR determinants; secretory component (SC), amylase, lysozyme, IgA, IgM and IgD in fetal and postnatal salivary glands. Adv Exp Med Biol 216:1431-1438, 1987.
171. TSUMORI, H.; KURAMITSU, H. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme. Oral Microbiol Immunol 12:274-280, 1997.
172. TSUDA, H.; YAMASHITA, Y.; TOYOSHIMA, K.; YAMAGUCHI, N.; OHO, T.; NAKANO, Y.; NAGATA, K.; KOGA, T. Role of serotype-specific polysaccharide in the resistance of *Streptococcus mutans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 68:644-650, 2000.
173. TYLER, B.M.; COLE, M.F. Characterization of the mucosal immune response in breast milk after peroral immunization of chimpanzees (*Pan troglodytes*) with *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 44:871-883, 1999.
174. VAN HOUTE, J.; GIBBS, G.; BUTERA, C. Oral flora of children with "nursing bottle caries". J Dent Res 61:382-385, 1982.
175. WAN, A.K.L.; SEOW, W.K.; PURDIE, D.M.; BIRD, P.S.; WALSH, L.J. TUDEHOPE, D.I. Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A

- longitudinal study from 0-18 months of age. *Oral Microbiol Immunol* 18:72-78, 2003.
176. WHILEY, R.A; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 13:195-216, 1998.
177. YAMANAKA, N.; FADEN, H. Antibody response to outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis-prone children. *J Pediatr* 122:212-218, 1993.
178. YAMASHITA, Y.; BOWEN, W.H.; BURNE, R.A.; KURAMITSU, H.K. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun* 61:3811-3817, 1993.

Anexos



Characterization of Salivary Immunoglobulin A Responses in Children Heavily Exposed to the Oral Bacterium *Streptococcus mutans*: Influence of Specific Antigen Recognition in Infection

Ruchele D. Nogueira,¹ Alessandra C. Alves,¹ Marcelo H. Napimoga,¹ Daniel J. Smith,² and Renata O. Mattos-Graner^{1*}

Department of Microbiology and Immunology, Piracicaba School of Dentistry, University of Campinas, São Paulo, Brazil,¹ and Department of Immunology, The Forsyth Institute, Boston, Massachusetts²

Received 16 February 2005/Returned for modification 22 March 2005/Accepted 12 April 2005

The initial infection of children by *Streptococcus mutans*, the main pathogen of dental caries, depends on the ability of *S. mutans* to adhere and accumulate on tooth surfaces. These processes involve the adhesin antigen I/II (AgI/II), glucosyltransferases (GTF) and glucan-binding protein B (GbpB), each a target for anticaries vaccines. The salivary immunoglobulin A (IgA) antibody responses to *S. mutans* antigens (Ags) were characterized in 21 pairs of 5- to 13-month-old children. Pairs were constructed with one early *S. mutans*-infected and one noninfected child matched by age, racial background, number of teeth, and salivary levels of IgA. Specific salivary IgA antibody response and *S. mutans* infection levels were then measured during a 1-year follow-up. Robust responses to *S. mutans* were detected from 6 months of age. Salivary IgA antibody to AgI/II and GTF was commonly detected in salivas of all 42 children. However, GbpB-specific IgA antibody was seldom detected in the subset of infected children (38.1% at baseline). In contrast, most of the subset of noninfected children (76.2%) showed GbpB-reactive IgA antibody during the same period. Frequencies of GbpB responses increased with age, but differences in intensities of GbpB-IgA antibody reactions were sustained between the subsets. At baseline, GbpB-reactive IgA antibody accounted for at least half of the total salivary IgA *S. mutans*-reactive antibody in 33.3 and 9.5% of noninfected and infected children, respectively. This study provides evidence that a robust natural response to *S. mutans* Ags can be achieved by 1 year of age and that IgA antibody specificities may be critical in modulating initial *S. mutans* infection.

Streptococcus mutans is considered to be pathogenic for dental caries, because of its ability to adhere and accumulate in the dental biofilm in the presence of sucrose and to produce and tolerate high concentrations of acids, which promote tooth demineralization. Three main cell-associated antigens (Ags) of *S. mutans* have been shown to be involved in the capacity of these microorganisms to adhere and accumulate in the dental biofilm. These antigens include an adhesin (AgI/II), glucosyltransferases (GTF) which synthesize glucan from sucrose, and glucan-binding protein B (GbpB) (21, 38, 39, 42). The biological role of these Ags in virulence has been demonstrated in animal models (3, 32, 35, 42) or in in vitro studies of biofilm formation (24). Several studies have also demonstrated that induction of specific antibodies against each antigen can confer protection from dental caries development in animal models (16, 18, 39). The studies formed the basis for the use of these antigens in phase one clinical trials of caries vaccines in adults and older children (10, 36).

Although *S. mutans* can be detected in caries-free subjects, high proportions of these organisms in the dental biofilm are consistently associated with high caries activity (39). The earlier children become infected with *S. mutans*, the more likely they are to develop dental caries (19). Initial establishment of

S. mutans seems to be associated with the eruption of primary molars, which normally takes place between 19 to 30 months of age. It is thought that these teeth provide noncolonized and retentive surfaces for *S. mutans* biofilm formation (6). This period has been defined as a window of infectivity because after about 30 months of age there is a decreasing risk for *S. mutans* acquisition (6). It has been argued that this reduced risk of infection results from the establishment of a competitive commensal microbiota on tooth surfaces (6, 7). However, the influence of the maturation of the host immune system on this process is unclear. Although high sucrose intake can promote heavy *S. mutans* infection associated with severe caries (40), differences in sucrose consumption do not always result in different *S. mutans* infection levels and caries development. For example, within a high-sucrose-exposed population of nursery children, we have observed a small subset of heavily infected children from 24 to 30 months of age who did not develop the disease (23). In fact, in this subset, *S. mutans* levels were often subsequently reduced during a 1-year follow-up period (23). High fluctuations in *S. mutans* levels had also been observed in a population at low risk for caries after 30 months of age (31). Variations in immunological status and the virulence of *S. mutans* infecting genotypes may account for these observations.

Previous studies have indicated a high diversity of patterns of salivary immunoglobulin A (IgA) response to *S. mutans* Ags in children and adults (4, 5, 31). However, there has been no consistent evidence that differences in patterns of salivary IgA

* Corresponding author. Mailing address: Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Av. Limeira, 901, CEP 13414-903 Piracicaba, São Paulo, Brazil. Phone: 55 19 3412 5379. Fax: 55 19 3412 5218. E-mail: rmgraner@fop.unicamp.br.

specificities or intensity of response influence the susceptibility to *S. mutans* infection and caries development.

We hypothesize that the capacity to mount salivary IgA antibody responses to virulence-associated antigens early in life may influence the ability of *S. mutans* to infect or to accumulate to significant levels in the oral cavity. To address this hypothesis, we have characterized the intensity and specificity of salivary IgA levels to *S. mutans* antigens in a 1-year prospective study of 5- to 13-month-old children at high risk of infection. Subjects were drawn from a population with low socioeconomic status, high sucrose intake, and heavy exposure to *S. mutans* (23, 27). Specific patterns of IgA antibody response to *S. mutans* and *Streptococcus mitis* antigens were compared between 21 matched pairs of children who were either infected or not infected at an early age with *S. mutans*. The results suggest that early robust responses to *S. mutans* GbpB are associated with initial resistance to infection in this population.

MATERIALS AND METHODS

Study population and design. The study population included all the 5- to 13-month-old children who attended the 28 public nursery schools in the city of Piracicaba, São Paulo, Brazil (Escolas Municipais de Ensino Infantil [EMEIs]). Thus, at the time of the initial visits, a total of 160 children were enrolled at baseline. Because these institutions follow the same policy for care provision, children are provided with a nearly homogeneous sucrose-rich diet during the 10-h period that they stay in the EMEIs. The dietary schedules at the EMEIs consists of five meals provided at 2- to 3-h intervals, four of which include beverages and/or solid food with high concentrations of sucrose (for details, see reference 23). Exposure to fluoride and habits of oral hygiene are also quite similar between the EMEIs (23). Mothers of all children enrolled in the study have previously signed informed consents (approved by the Ethical Committee of the University of Campinas-School of Dentistry of Piracicaba, São Paulo, Brazil, proc. 110). These children are part of a prospective study with a 1.5-year duration that sought to analyze the sources of *S. mutans* infection and the diversity of initially infecting *S. mutans* genotypes. Clinical exams for the determination of the number of erupted teeth and caries lesions were performed by a single trained examiner (A. C. Alves), following criteria previously described elsewhere (23, 27). During the follow-up, a total of 141 children remained in the study. Examination of these 141 children and collection of salivary and/or microbiological samples were performed at baseline (time zero [T_0]), at 6 months (T_6), and at 12 months (T_{12}) after baseline measurements. To analyze the influence of the salivary immune response on infection, a subset of 42 children consisted of 21 pairs of children in which one child was colonized at T_0 or T_6 with *S. mutans* and the other child was not colonized at either time point. The *S. mutans*-infected group included all the 21 children with detectable levels of *S. mutans* at T_0 and T_6 . Noninfected children were sorted by several variables of putative influence on *S. mutans* infection levels to assemble the 21 pairs. Thus, children were matched by gender, age, number of erupted teeth, total levels of salivary IgA, and sucrose intake at home. If more than one noninfected child matched the respective *S. mutans*-infected subject, only one was selected randomly.

Saliva sampling. Samples of unstimulated whole saliva were collected from the floor of the mouth during the child's daily residence at the EMEI, using sterile polypropylene graduated transfer pipettes. Collections were performed at least 1 h after feeding to avoid contamination with nonsalivary components. Approximately 200 to 500 μ l of saliva was transferred to 1.5-ml tubes to which 10 μ l of 250 mM EDTA had been added. Samples were placed on ice and processed within 1 h of collection. Salivas were clarified by centrifugation at $13,000 \times g$ at 4°C for 10 min, and the supernatants were collected and frozen at -70°C until laboratory analysis. Total concentration of protein in salivas was determined by the method of Bradford to check for variations in salivary flow (Sigma, St. Louis, MO). Samples from children with mucosal breaks were excluded from the analysis.

Determination of *S. mutans* and antigen preparation. Oral samples were collected with sterile tongue blades and inoculated onto Rodac plates containing MSB (mitis salivarius agar supplemented with 0.2 U of bacitracin per ml and 20% sucrose; Difco, Sparks, MD) using a method previously described (20), with

modifications (23). Briefly, a sterile tongue blade was introduced in the mouth and rotated until humidified with saliva. Tongue blades were pressed by both sides on the dorsum of the tongue to remove excess saliva and were immediately pressed against the convex surface of the MSB agar. Plates were transported to the laboratory within a maximum of 1 h and incubated at 37°C in candle jars for 48 h to 72 h. The number of *S. mutans*-like colonies was determined using a stereoscopic microscope in a predetermined area (1.5 cm²) of the tongue blade impression. A total of eight isolates was picked from each plate, unless a lower number of colonies was obtained. Thus, one to eight colonies per child were selected. This number of isolates was selected based on previous studies that showed that testing more than eight isolates did not significantly increase the likelihood of additional genotype detection (22). Attempts were made to select the colonies that were representative of the colonial morphologies observed. Isolates were picked from each plate, regrown, and stored at -70°C as previously described (20). The genotypic identity of the *S. mutans* isolates was determined by arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR), also as previously described (25).

For antigen preparation, protein extracts were obtained from one *S. mutans* isolate representative of each AP-PCR genotype identified in each infected child. For this purpose, colonies from fresh cultures in Todd Hewitt agar were inoculated into tubes with 3 ml of Todd Hewitt broth (Difco) and incubated in candle jars for 18 h. Bacterial cells were then harvested from 1 ml of cultures previously adjusted to an A_{250} of 1.0. Cell pellets were then boiled in Laemmli buffer for 5 min, and protein extracts were separated by centrifugation at 4°C ($10,000 \times g$ for 4 min). Protein concentrations were determined by the method of Bradford. A total of 16 μ g of protein extract was separated in sodium dodecyl sulfate-6% polyacrylamide gels and stained with Coomassie blue R 250 (Bio-Rad, Hercules, CA) for evaluation of the protein profiles. The same procedures were performed with two strains of *S. mitis*, the clinical isolate 54EL1 and strain ATCC 903. The latter was selected as a control *S. mitis* standard applied in all immunoblotting experiments because it showed the highest number of protein bands.

Determination of salivary immunoglobulin by ELISA. Total levels of IgA were determined in capture enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using microtiter plates (Costar 3590, Corning, NY) coated for 24 h at 4°C with 2 μ g/ml of goat IgG anti-human IgA in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Unless stated elsewhere, all antibody reagents were affinity purified and obtained from Zymed Laboratory (South San Francisco, CA). After being coated, plates were washed and blocked for 1 h at room temperature with bovine serum albumin (0.1%) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5. Diluted saliva samples (1:200 in PBS) were applied in triplicate, and plates were incubated for 2 h at room temperature. All experiments included serial dilutions (1.0, 0.5, 0.25, and 0.125 μ g/ml) of a standard sample of human IgA antibody purified from serum (Sigma) and a standard sample of pools of saliva collected from one adult subject. The secondary antibody was biotin-conjugated goat IgG anti-human IgA (Sigma) at a dilution of 1:14,500. After incubation with a solution of streptavidin, conjugated with alkaline phosphatase (Sigma) (1:500 in PBS, pH 7.5), antibody reactions were revealed by incubation with the substrate *p*-nitrophenyl phosphate disodium (34). To obtain the A_{405} units, plates were read in an ELISA plate reader (VersaMax, Molecular Devices). Negative controls included uncoated, no saliva, and no primary antibody wells. For determination of IgA concentrations, absorbance values were plotted against the standard curve obtained for the serial dilutions of the purified human IgA within a linear range.

Western blot analysis of salivary antibody to *S. mitis* and *S. mutans* antigens. To analyze the influence of patterns of specificity of IgA response to *S. mutans* Ags in the levels of infection, Western blot assays were performed using saliva samples collected at T_0 and T_6 . Salivas of both children in each pair were tested against Ags extracted from one isolate representative of each AP-PCR profile identified in the infected child of the pair. Ag extracts from a standard *S. mutans* strain (3VF2) were also included in all assays. Thus, the salivary response to *S. mutans* Ags was determined for at least two distinct genotypes. Salivas collected from six children infected by two to three isolates with distinct AP-PCR profiles were tested against Ags extracted from all genotypes identified. As a control for the maturation of immune response, Western blot assays were also performed to check the complexity of salivary IgA antibody response to *S. mitis* strain ATCC 903.

For Western blotting, a total 16 μ g of protein of the Ag extracts was loaded per lane, separated by sodium dodecyl sulfate-6% polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes (26). After being stained with Red Ponceau (Sigma), membranes were washed and blocked overnight at 4°C (in Tris-buffered saline-Tween, pH 7.5, 5% nonfat milk). Incubations with salivas diluted 1:100 were performed at room temperature for 2 h. As negative controls, membranes were incubated only with blocking buffer, and as positive controls, membranes were incubated with a standard saliva sample obtained from an adult

subject whose pattern of reaction with *S. mutans* and *S. mitis* antigen extracts had been previously measured. The secondary antibody was goat IgG anti-human IgA conjugated with horseradish peroxidase (1:4,000 dilution). Antibody reactions were developed using an ECL system (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). For this purpose, immunoblots were incubated with ECL detection solution and then exposed to the same X-ray film for 5 min. The developed X-ray films were scanned in a scanning densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer) to analyze patterns of antigen recognition, including the number and intensity of reactive bands. Migration positions of AgI/II, GtfC, and GbpB in all Ag extracts were determined in parallel Western blot assays performed with rabbit antiserum specific to AgI/II (kindly provided by Michael W. Russell from the State University of New York at Buffalo, NY), monoclonal antibody against GtfC (kindly provided by Kazuo Fukushima from the University of Matsudo at Chiba, Japan), and specific polyclonal rat antiserum to GbpB (38). To further strengthen the specificities of salivary IgA to GbpB, fast protein liquid chromatography-purified GbpB, obtained as previously described (30), was applied in blots and probed with representative saliva samples that have shown strong GbpB reactivity patterns in assays with Ag extracts. Similar experiments with purified GTF or AgI/II were not performed, because no significant differences in recognition of these Ags were detected in Ag extracts between the subsets of children, as later described, and because there was insufficient saliva volume for these assays.

Statistical analysis. Comparisons of the frequencies of children with distinct IgA antibody specificities were tested by a chi-square test. Differences in the densitometry values of reactive Ags between the subsets of infected and noninfected children were analyzed by a Mann-Whitney U test. To compare patterns of Ag recognition between distinct *S. mutans* genotypes, the number of coincident IgA-reactive bands between all the genotypes tested was determined. These values were divided by the number of the total IgA-reactive bands observed for the genotype that showed the highest number of IgA-reactive bands. The mean number of IgA-reactive bands in Ag extracts from *S. mitis* was also determined and compared between the subsets of the *S. mutans*-infected and noninfected children and with the mean number of reactive bands in Ag extracts from *S. mutans* genotypes.

RESULTS

Salivary levels of IgA. Figure 1 shows the fluctuations in the levels of salivary immunoglobulins observed at baseline (T_0) and at a 6-month follow-up (T_6). High variability in the concentration of total salivary IgA was observed among the 141 children from whom the 21 pairs of children were selected, even when concentration values were normalized by the total concentration of protein (Fig. 1). The mean value of IgA concentration at baseline was 97.5 $\mu\text{g/ml}$ (standard deviation [SD], 91.5). A significant increase in IgA concentration was detected at T_6 (mean, 473.6 $\mu\text{g/ml}$; SD, 195.7). Ratios of values of IgA normalized by protein concentration also increased from T_0 (mean ratio, 0.15; SD, 0.15) to T_6 (mean ratio, 0.50; SD, 0.30). Among the subset of 21 *S. mutans*-infected children, median levels of IgA were 79.7 and 498.8 $\mu\text{g/ml}$ at T_0 and T_6 , respectively. These levels did not significantly differ from median levels of their noninfected pairs in both phases of the study (85.3 and 484.2 $\mu\text{g/ml}$ at T_0 and T_6 , respectively).

Mutans streptococcal infection and caries experience in the 21-pair subset. At baseline, *S. mutans* was recovered from five (3.1%) children. After a 6-month follow-up (T_6), a total of 21 children (14.9%) presented detectable levels of *S. mutans*. The median age of infection was 17 months. In this subset of 21 children, *S. mutans* infection ranged from low levels (1 CFU) to heavy levels (>100 CFU) (median, 40 CFU per predetermined area). Mean levels of *S. mutans* infection at T_6 was 44.5 CFU/area (SD, 40.6). After the 1-year follow-up (T_{12}), six children from the infected group who previously carried 1 to 50 CFU of *S. mutans* showed no detectable levels of *S. mutans* (pairs 1, 2, 3, 4, 17, and 21) (Table 1). Also at T_{12} , five children

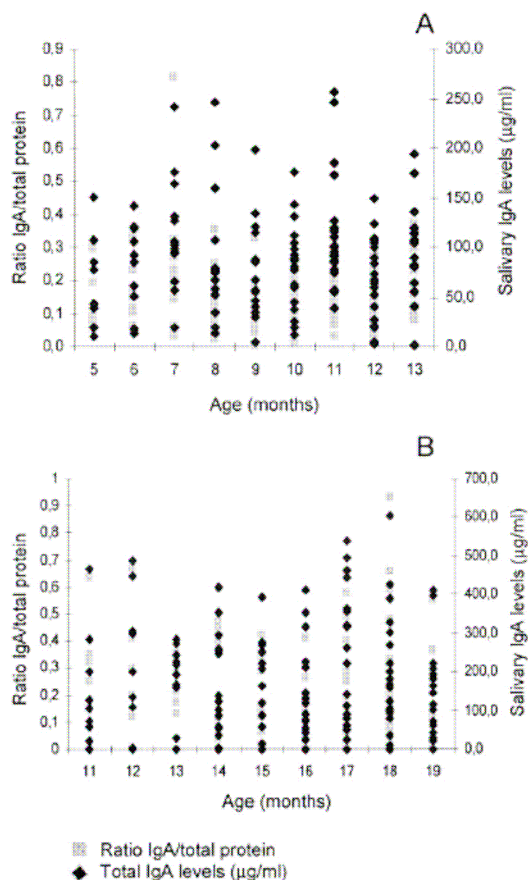


FIG. 1. Levels of salivary IgA observed among 141 children who were between 5 to 13 months of age at baseline. (A) Salivary IgA concentrations after a 6-month follow-up are also shown. (B) Shaded squares represent the ratios of total salivary IgA amounts ($\mu\text{g/ml}$) that were divided by values of total protein concentration ($\mu\text{g/ml}$) measured in the same samples. Black squares represent absolute amounts of IgA in salivas ($\mu\text{g/ml}$).

from the noninfected group showed detectable levels of *S. mutans* (pairs 2, 3, 13, 14, and 21) (Table 1). At this time, *S. mutans* levels ranged from 23 to >100 CFU mutans streptococci, and the mean level of infection was 31.5 CFU/area (SD, 37.4). Percentages of *S. mutans*-infected children ($n = 21$) with caries lesions were 4.8 ($n = 1$), 23.8 ($n = 5$), and 61.9% ($n = 13$) at T_0 , T_6 , and T_{12} , respectively. Caries scores at T_{12} ranged from 1 to 7 cavities (mean, 0.70 ± 1.62) and 1 to 16 white spot lesions (mean, 2.14 ± 4.10). Within the noninfected group, no children presented signs of caries at T_0 . At T_6 , two (9.5%) children (numbers 7 and 13) presented with white spot lesions. At T_{12} , white spot lesions were detected only in children numbers 13 and 14, because lesions detected at T_0 in child 7 had

TABLE 1. Total levels of salivary IgA, intensities of GbpB-specific IgA reactions, and percentage of intensities of IgA reactive to GbpB to the sum of intensities of total *S. mutans*-reactive IgA bands in pairs of *S. mutans*-infected and noninfected children at baseline and after a 6-month follow-up

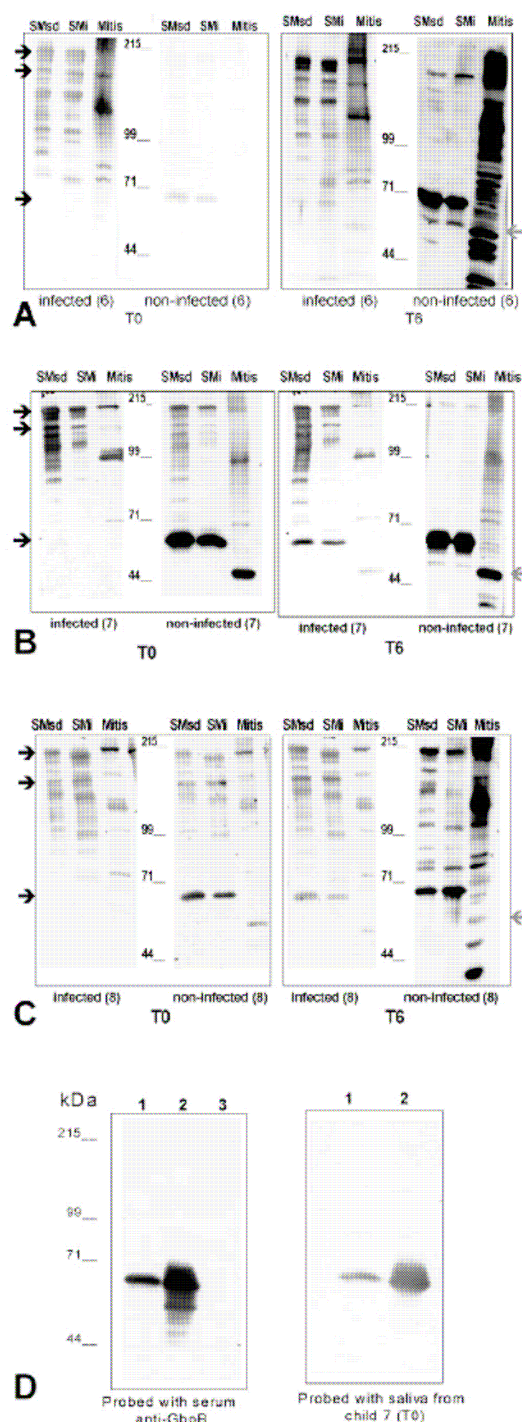
Subject	Age at <i>S. mutans</i> detection (months)	IgA titer (μg/ml) at:		Intensities of reactions to GbpB ^c at:		% of reaction to GbpB to total SM-antigens ^d at:	
		T ₀	T ₆	T ₀	T ₆	T ₀	T ₆ ^e
<i>S. mutans</i> -infected							
1 ^a	12	52.7	781.7		43.0		3.1
2 ^a	11	91.0	56.2	90.4	302.8	7.6	18.8
3 ^a	6	61.8	214.3				
4 ^a	8	79.7	283.4				
5	13	120.0	616.3				
6	18	20.2	317.1		8.5		1.5
7	19	1.5	466.1		32.0		10.3
8	17	131.4	100.2		37.0		13.8
9	14	19.6	249.4		11.7		14.5
10	16	512.0	512.0		2.3		6.5
11	19	108.3	744.0	219.9	149.1	20.7	9.0
12	16	45.9	536.5	79.7	42.3	15.2	12.2
13	19	18.7	58.9	105.0	342.0	18.7	93.6
14	13	77.4	498.8		9.1		16.0
15	14	94.1	482.4				
16	19	83.9	443.8	22.3	25.6	8.4	64.4
17 ^a	19	66.9	561.3	31.7	255.2	20.3	100.0
18 ^c	20	73.6	576.6				
19	17	143.1	822.2				
20	17	246.8	656.0	57.7	33.9	100.0	100.0
21 ^{a,e}	21	193.9	601.9	36.1	199.0	69.8	100.0
Noninfected pair							
1		55.1	732.6		54.0		8.6
2 ^b	22	92.3	428.6	22.0	15.3	0.9	1.0
3 ^b	19	66.1	575.5		730.0		19.1
4		75.2	503.2				
5		104.8	348.1	86.1	120.1	15.1	100.0
6		19.6	426.4	27.0	315.0	64.5	64.4
7		3.6	598.9	312.0	400.0	59.9	91.4
8		88.5	727.0	87.0	119.8	50.0	20.5
9			663.6	6.8	50.3	3.5	39.2
10		87.1	347.4	13.7	53.0	2.1	19.7
11		104.4	320.5	13.5		1.1	
12		55.3	495.8		48.0		11.0
13 ^b	31	4.6	454.7		90.8		17.4
14 ^b	27	85.4	565.4	270.3	82.3	21.8	20.0
15		85.2	261.3				
16		89.8	619.2	5.0	37.9	1.4	35.2
17		64.5	446.7	4.0	21.2	31.0	95.1
18		82.1	418.3	0.8	84.0	100.0	24.5
19		116.1	754.4	2.4	16.0	100.0	100.0
20		256.7	484.2	134.2	10.4	76.3	80.0
21 ^b	32	113.0	142.4	9.3	88.1	80.2	78.6

^a Children with non detectable levels of SM after 1 year.^b Children with detectable levels of *S. mutans* after 1 year.^c Intensities were determined by the densitometry of reactive bands.^d Densitometric values of IgA-reactive GbpB bands were divided by the sum of the densitometric values measured in all IgA reactive bands and expressed as percentage values.^e Second exam (T_6) was performed 8 months after baseline examination.

regressed. From this same group, child number 13 also presented with one cavity. At T_{12} , children had a median of 16 erupted teeth; all 20 teeth were erupted in only six children (three from each subgroup).

Complexity of IgA response to *S. mutans* and *S. mitis* antigens. Significant complexity in IgA antibody responses to *S. mutans* Ags, as defined by the number of IgA-reactive bands, was identified in salivas of children as young as 6 months of age. The level of complexity was quite variable among the

children studied. The complexities of response at T_0 or T_6 were not associated with age nor with levels of mutans streptococci (Pearson's r , -0.21 to -0.10 ; $P > 0.40$, for the 3VF2 strain Ag extract). The number of IgA-reactive *S. mutans* 3VF2 bands ranged from 0 to 13 (mean, 7.2 ± 3.8) and 0 to 14 (mean, 6.3 ± 3.8) at T_0 and T_6 , respectively. There were no significant differences in the mean number of reactive Ags between the subsets of infected and noninfected children at T_0 and T_6 (Mann-Whitney U test, $P > 0.6$).



The number of IgA-reactive *S. mitis* bands ranged from 0 to 17 (mean, 7.2 ± 4.7), and from 1 to 19 (mean, 8.2 ± 4.2) at T_0 and T_6 , respectively. The degree of complexity of response to *S. mutans* was associated with the complexity of response to *S. mitis* both at T_0 (Pearson's r , 0.37; $P < 0.02$) and at T_6 (Pearson's r , 0.40; $P < 0.02$). Comparison of patterns developed with salivary IgA antibody to *S. mutans* Ags and *S. mitis* Ags at T_0 and T_6 revealed that specificities to these two oral species were not related, except for a single *S. mitis* Ag of approximately 44.9 kDa that was frequently recognized when GbpB-reactive IgA was detected in the same saliva (Fig. 2). This reactivity with the 44.9-kDa *S. mitis* component was not due to cross-reactive antibodies to *S. mutans* GbpB, because polyclonal antibodies to GbpB did not recognize the smaller *S. mitis* Ag (Fig. 2D).

Antigenic variations among *S. mutans* genotypes. Potential differences in salivary IgA antibody reactivity with Ags from indigenous versus stock strains of *S. mutans* were analyzed comparing the numbers of IgA antibody-reactive bands of the same size between each infecting genotype (isolated from the infected child) and the standard 3VF2 strain. Median percentage values of coincident bands to total number of bands identified were 77.5 and 67.0% for T_0 and T_6 , respectively. Examples of immunoblots comparing the standard and one infecting *S. mutans* strain per infected subject are shown in Fig. 2. In addition, patterns of response were compared between strains representative of each infecting *S. mutans* genotype in the six children who were infected by two to four distinct genotypes, as identified by AP-PCR (Fig. 3). Although some differences in patterns were observed between genotypes, reactions to Ags AgI/II, GTF, and GbpB were very similar in frequency and intensity, even when slight differences in migration occurred, as, for example, the GbpB from genotype *S. mutans* 7 recovered from child number 17 (Fig. 3). Also the total numbers of reactive bands of the standard and infecting genotypes were highly associated both at T_0 and at T_6 (Pearson's r , 0.81 [$P < 0.001$] and 0.69 [$P < 0.001$], respectively).

Specific antibody levels to AgI/II, GTF, and GbpB. Identities of AgI/II, GTF, and GbpB in Ag extracts from all the *S. mutans* genotypes tested were confirmed in parallel Western blot assays using the respective specific antibodies. Representative

FIG. 2. (A to C) Patterns of IgA specificities against antigens from *S. mutans* genotypes and *S. mitis* (strain ATCC 903) in three pairs of children. Identities of antigen extracts are above each lane. SMsd, Ag extracts from the *S. mutans* strain 3VF2; SMi, Ags obtained from one infecting *S. mutans* genotype isolated from the infected child of each pair; Mitis, Ag extracts of *S. mitis*. Immunoblots from left and right panels are reactions obtained with salivas collected at baseline (T_0) and after a 6-month follow-up (T_6), respectively. The identity number of each *S. mutans* infected and noninfected child of each pair is shown within parentheses below each immunoblot. Standard molecular sizes (kDa) are indicated between the immunoblots of each pair. Black arrows at left indicate positions of AgI/II, GtfC, and GbpB in the *S. mutans* extracts, in decreasing order of size. Shaded arrows at right indicate the 44.9-kDa Ag of *S. mitis*. (D) Specificities of IgA response to GbpB. Lanes 1, Ag extract from strain 3VF2; lanes 2, fast protein liquid chromatography-purified GbpB; lane 3, Ag extract from *S. mitis* strain. Immunoblot at left was probed with polyclonal rat antiserum to GbpB. Immunoblot at right was probed with a 1:100 dilution of a saliva sample from noninfected child number 7, collected at T_0 .

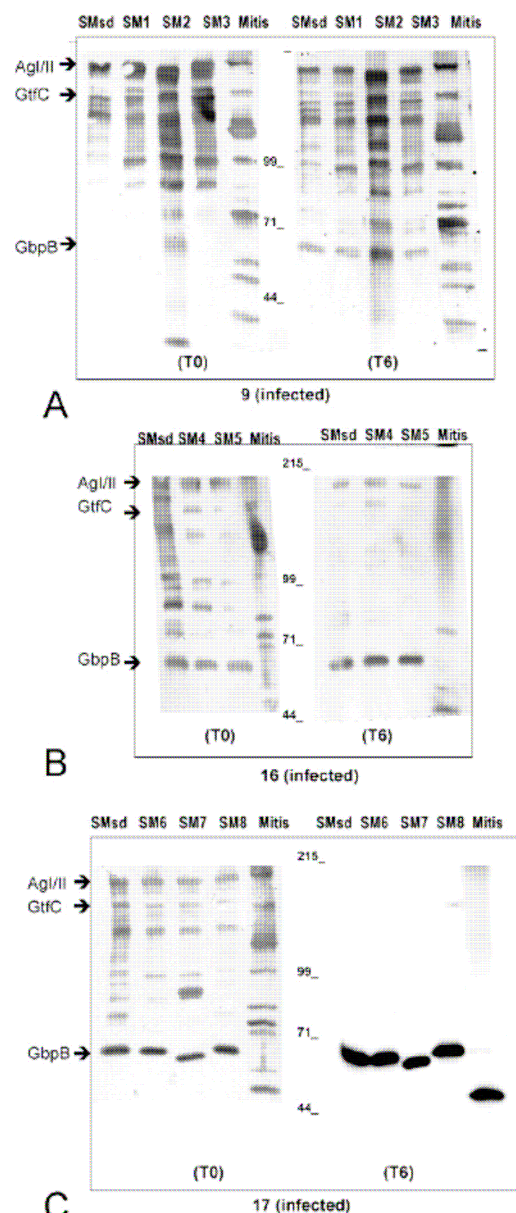


FIG. 3. Comparisons of patterns of salivary IgA reactivity with antigens from distinct *S. mutans* genotypes in three representative children infected by two to three genotypes. *S. mutans*-infected children were from pairs number 9 (A), 16 (B), and 17 (C). Reactions are with salivas collected at baseline (T_0) and after 6 months (T_6). Identities of *S. mutans* Ags are indicated above each lane. SMsd, standard strain 3VF2; SM1 to SM8, infecting *S. mutans* genotypes; Mitis, *S. mitis*. Molecular size standards (kDa) are indicated between T_0 and T_6 immunoblots. Positions of AgI/II, GtfC, and GbpB are indicated at left. AgI/II migrated to positions respective to approximately 194 kDa.

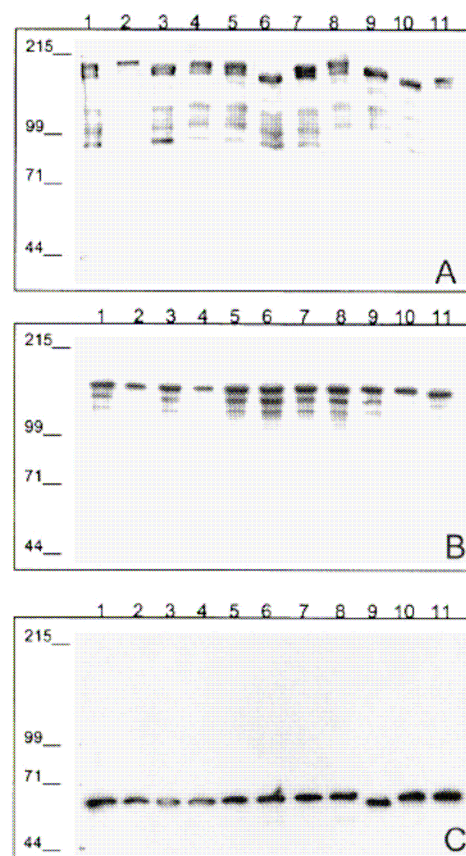


FIG. 4. Representative gels for localization of AgI/II, GtfC, and GbpB in protein extracts from distinct *S. mutans* genotypes. A total of 16 μ g of protein was loaded per lane, and membranes were probed with rabbit antiserum specific to AgI/II (A), monoclonal antibody P32 anti-GtfC (B), or rat antiserum specific to GbpB (C). Each lane represents a distinct genotype of *S. mutans*. Molecular sizes (kDa) are indicated at left. AgI/II was the most variable in migration pattern, with approximate sizes ranging from 180.3 to 200.5 kDa; the most common size was 194 kDa. GtfC proteins show approximate sizes of 158.9 kDa. GbpB was about 60 kDa, although in the protein extract at lane 9 it has migrated to a position of approximately 58.5 kDa.

immunoblots where these Ags were probed with specific antibodies are shown in Fig. 4. Variation in the migration patterns was higher for AgI/II (Fig. 4A). Sizes of this Ag were between 176.6 to 200.5 kDa, as calculated with base on standard proteins. GtfC migrations were less variable, with approximate sizes of 158.9 kDa, while GbpB sizes varied from 62.9 to 58.5 kDa. Besides differences in migration, variations in the inten-

GtfC proteins were approximately 158.9 kDa. GbpB proteins were of approximately 60 kDa. Note that GbpB from genotype *S. mutans* 7 migrated to a position calculated as 58.5 kDa.

TABLE 2. Comparisons of the frequencies of children with positive salivary IgA responses to Ags from distinct *S. mutans* genotypes and to *S. mitis* at baseline (T_0) and after a 6-month follow-up (T_6) between *S. mutans*-infected and their respective noninfected matches and mean number of Ags recognized by each group at phases T_0 and T_6

Strain and antigen extract	No. (%) of children with positive salivary IgA response at T_0 ($n = 21$)		No. (%) of children with positive salivary IgA response at T_6 ($n = 21$)	
	Infected	Noninfected	Infected	Noninfected
<i>S. mutans</i>				
Standard strain				
Ag I/II	19 (90.4)	17 (81.0)	16 (76.2)	17 (81.0)
Gtfs	17 (81.0)	17 (81.0)	14 (66.7)	14 (66.7)
GbpB	8 (38.1) ^a	16 (76.2) ^a	15 (71.4)	18 (85.7)
Mean number of reactive Ags $\pm$ SD	7.6 $\pm$ 3.6	6.9 $\pm$ 4.0	6.1 $\pm$ 4.2	7.7 $\pm$ 3.0
Infecting genotype ^b				
Ag I/II	18 (85.7)	16 (76.2)	16 (76.2)	17 (81.0)
Gtfs	18 (85.7)	16 (76.2)	15 (71.4)	14 (66.7)
GbpB	8 (38.1) ^a	16 (76.2) ^a	15 (71.4)	19 (90.4)
Mean number of reactive Ags $\pm$ SD	6.4 $\pm$ 2.8	6.5 $\pm$ 3.9	5.8 $\pm$ 3.5	5.7 $\pm$ 2.3
<i>S. mitis</i>				
44.9 kDa Ag	12 (57.1)	13 (61.9)	18 (85.7)	17 (81.0)
Mean number of reactive Ags $\pm$ SD	6.7 $\pm$ 4.7	7.6 $\pm$ 4.7	8.5 $\pm$ 3.6	8.0 $\pm$ 4.8

^a Differences between infected and noninfected groups: chi-square = 4.76, $P < 0.02$.

^b Only the genotype with highest number of IgA-reactive bands was selected for the analysis among the two or more infecting genotypes tested in children infected by multiple genotypes.

sities of each Ag between the extracts were detected (Fig. 4). The number of children that demonstrated detectable IgA antibody reactions that were specific to these Ags is shown in Table 2. IgA antibody responses to AgI/II and GTF in salivas from infected and noninfected children showed no discernible differences with respect to infection. However, a significant difference in the frequency of GbpB recognition was identified between infected and noninfected children at baseline (Table 2) (chi-square test, 6.07, $P < 0.02$). At this time, only 38.1% of children infected with *S. mutans* showed GbpB-reactive IgA antibody. In contrast, 76.2% of the salivas from noninfected children contained detectable antibody to this Ag at T_0 . Six months after baseline measurements, the detection of antibody to GbpB was similar in both groups as a consequence of an increase in response within the infected group. Six children of the *S. mutans*-infected subset did not show detectable levels of *S. mutans* after one year (T_{12}), while after this same period, five subjects from the noninfected group showed detectable levels of *S. mutans*. These 11 children were belonged to eight of the pairs studied (1–4, 13, 14, 17, 21). Excluding these eight pairs from the analyses, differences in frequencies of GbpB recognition at T_0 turned out to be more evident, being significantly lower among the infected group (chi-square test, 7.42, $P < 0.02$).

Large variations in intensities of GbpB-recognized bands were observed in both groups. At T_0 , mean intensities of GbpB IgA-reactive bands were 30.6 (SD, 54.9) and 47.5 (SD, 88.7) for infected and noninfected groups, respectively. At T_6 these values changed, respectively, to 72.1 (SD, 108.5) and 111.2 (SD, 173.8). The large variations occurred because GbpB-reactive IgA accounted for 50 to 100.0% of the total *S. mutans*-reactive salivary IgA antibody in 9.5 and 33.3% of infected and noninfected subsets, respectively, at T_0 . After 6 months, these percentages changed to 23.8 and 33.3%, respectively. The median relative intensity of GbpB reaction with specific IgA was smaller in the subset of infected children than in the noninfected children in both phases T_0 (0.0 versus 3.5) and T_6 (10.3

versus 20.5), although these differences did not achieve statistical significance. However, if the eight pairs of children who did not sustain their infected or noninfected condition after the 1-year follow-up (T_{12}) were excluded from the analysis, differences in the median intensities of GbpB IgA-reactive bands achieved statistical significance when infected and noninfected children were compared (Mann-Whitney U test, $P < 0.03$) in both T_0 (0.0 versus 15.1) and T_6 (9.0 versus 35.3). Ratios of densitometry measures of GbpB-reactive bands to total levels of IgA in salivas have shown that noninfected children have developed proportionally more antibodies to this particular Ag compared to *S. mutans*-infected matches. At T_0 , these ratios were 0.00 and 0.06 for the subsets of infected and noninfected children, respectively. At T_6 , these ratios were 0.05 to 0.09 for the respective groups.

DISCUSSION

S. mutans is transmitted to children through contact with saliva from infected individuals. These bacteria can be detected using culture methods by 19 to 30 months of age, with a median age of approximately 26 months (6, 31). In populations at high risk for caries, *S. mutans* can be detected in high frequency by the end of the first year of life (23, 27) or even in preterm 5- to 6-month-old children (28). In severe cases of caries development, mutans streptococci may comprise up to 60% of the total cultivable organisms in the dental biofilm (40). In this study, we analyzed a population defined as heavily exposed to *S. mutans*, because of previous studies showing a high prevalence of early and heavy infection associated with caries incidence (23, 27) and earlier data indicating early *S. mutans* transmission from maternal (17) and nonmaternal (25) sources. Additionally, a sucrose-rich diet was provided in the nurseries during the 10-h period of day care (23). Caries lesions were detected at a very young age in the early *S. mutans*-infected group; 62% of children presented 1 to 17 caries lesions by T_{12} , within an age range where teeth had not

completed or had nearly completed eruption. The median age of the initial *S. mutans* detection in the infected group was 17 months, which is lower than that reported in other populations. Except for the first five children of the infected group (from pairs 1 to 5) (Table 1) whose median age of infection was 11 months, all other *S. mutans* detections occurred at the second exam (T_6) at a median age of 17.5 months. This enabled us to analyze specific IgA antibody responses in the earliest phases of *S. mutans* challenge that potentially would lead to infection. The establishment of competitive commensal bacteria on teeth has been associated with decreased risk for *S. mutans* colonization (7) and may be part of the reason for the low rate of initial acquisition of *S. mutans* after 2 to 2.5 years of age (6, 19, 23, 31). Reduced risk for acquisition of gram-positive and gram-negative pathogens in other mucosal areas, e.g., *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*, has been reported also to occur by the age of 2 years (12, 13, 15). Maturation in mucosal immune responses during this period was suggested to influence the colonization of these pathogens (12, 15). Significant increases in IgA levels observed from T_0 to T_6 (Fig. 1) were likely due to physiological maturation of the mucosal immune system.

Studies in older children and adults revealed a tendency for higher intensity and more complex patterns of IgA reaction to *S. mutans* Ags among low-infected and/or low-carries-active subjects in comparison to caries-active ones (4, 5). However, no specific pattern of IgA response was associated with susceptibility to infection. Because the degree of Ag challenge can influence the development of adaptive immune responses, variations in the intensity and duration of exposure to *S. mutans* in adults might interfere, in part, in the analysis of the independent influence of the immune response on infection in adult subjects. The intensity of the IgA antibody response to several common colonizers of the oral cavity has been shown to increase from birth to 4 years of age (37), which may reflect the increasing extent of cumulative antigenic challenge (37). On the other hand, IgA antibody reactivity with several oral bacteria species in childhood is reported in the absence of detectable levels of the respective species (1, 11, 31). Several hypotheses were raised to address this observation, including cross-reactive antibodies, anti-idiotypic induction, and antigenic exposure due to colonization of other mucosal sites, as well as the occurrence of transitory infection and variations in culture techniques (11, 37). Studies of salivary IgA antibody responses to known species-specific Ags involved in virulence and colonization may help to simplify associations between antibody response and *S. mutans* challenge and infection.

Three main groups of *S. mutans* surface Ags (AgI/II, GTF, and GbpB) have been shown to induce protective immunity against dental caries in animal models (16, 18, 39), but whether such responses can interfere with *S. mutans* infection or pathogenesis in humans is unresolved. In the present study, we show that an intense and complex pattern of salivary IgA responses to *S. mutans* Ags can be naturally achieved before 1 year of age (Fig. 2 and Table 1) in children who are under heavy challenge with *S. mutans*. We also observed that occurrence of salivary IgA antibody specific to *S. mutans* Ags, including AgI/II, GTF, and GbpB, is independent of detectable infectious levels (Table 2). The patterns of IgA antibody reactivity with *S. mutans* Ags were robust and comparable to the intensity of reactions

to Ag extracts from *S. mitis*, a pioneer colonizer of the oral cavity (33). These findings differ from a previous study performed in children in whom median *S. mutans* initial acquisition occurred at 27.5 months of age (31). In that study, *S. mutans*-specific IgA responses achieved a significant degree of complexity (at least six distinct reactive bands) generally by 28 to 34 months of age, although salivary IgA responses to *S. mitis* Ags were well developed within the 13 to 23 months of life. The absolute levels of IgA in the salivas tested were somewhat higher than observed in other reports (9). This may be a consequence of the use of a monomeric serum IgA (this study) rather than a dimeric secretory IgA standard. The much earlier and more intense challenge with *S. mutans* seen in the present study may partially explain the significantly earlier development of salivary IgA responses. Apart from these population differences, both studies suggest that persistently low levels of infectious challenge beneath the sensitivity of the bacterial culture techniques are sufficient to induce an *S. mutans*-specific secretory IgA antibody response, since both studies described complex *S. mutans*-specific IgA patterns in subjects whose infections were nondetectable. The sensitivity thresholds of sampling and culturing methods may limit detection of transitory or low-level *S. mutans* genotypes. It should also be noted that the application of a highly sensitive chemiluminescent method for antibody detection may have improved our ability to identify more intense and complex patterns of *S. mutans*-specific IgA.

An important insight provided by this study of matched infected and noninfected children is that the degree of *S. mutans* initial infection is not associated with intensity and complexity patterns of response but, rather, with the specificities of IgA to antigens relevant to *S. mutans* establishment in the dental biofilm. In this regard, GbpB-specific IgA appears to have a unique role in modulating the level of infection both in frequency and in intensity of response (Tables 1 and 2). In several children GbpB-specific IgA antibody accounted for more than 50% of the total *S. mutans* reactive IgA (Table 2), a trait that was more frequently detected in the noninfected group. GbpB was previously described as an immunodominant protein in children from 28 to 51 months of age (31) in adults (30) from the United States and in adults from Taiwan (where this protein is referred to as secreted antigen A) (8). Expression levels of GbpB are associated with the capacities of distinct *S. mutans* genotypes to grow as biofilms (24). Several polymorphisms have been described in GbpB (24) as well as in GTF genes (26), which might reflect antigenic variations that would facilitate infecting *S. mutans* genotypes to evade specific immune responses. However, significant differences in the patterns of specificity and intensity of IgA response when Ag extracts from distinct *S. mutans* genotypes were compared were not frequent (Table 2 and Fig. 3). No homologues of GbpB were identified in the commensal species of the oral cavity sequenced so far (e.g., *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, and *S. mitis*), or in the *Streptococcus sobrinus* species. On the other hand, GbpB homologues were identified in several pathogenic gram-positive species, e.g., *S. pneumoniae*, group B streptococcus, and *Enterococcus faecium* (24), and it would be interesting to analyze how the response to GbpB may interfere with infection by these other pathogens.

Children from populations that are modestly challenged with *S. mutans* display salivary IgA antibody specific for GTF

purified from *S. mutans* (14, 31). However, several commensal streptococci of the oral cavity produce variable numbers of GTF isotypes with distinct degrees of sequence similarity to the three GTF produced by *S. mutans* (GtfB, GtfC, and GtfD) (2). Differences in levels of *S. sanguinis* and *S. mutans* GTF-reactive antibodies within children indicate, however, that modest cross-reaction occurs at least between the counterparts produced by these two species (14). In the present study, close to 90% of the 42 studied children displayed salivary IgA antibody reactive to GTF. The lack of association between infection and the GTF-specific antibody response might be because the naturally induced GTF antibodies might have specificity for epitopes irrelevant for enzymatic activities. It has been shown that functionally relevant GTF peptides used in subunit anticaries vaccines are only modestly recognized by naturally induced human salivary IgA (35). We cannot exclude the possibility that IgA-reactive bands may include antibody reactions to separate proteins with equal migration patterns, especially with GtfC and AgI/II, for which we did not test representative salivas against the purified forms of these Ags. AgI/II was frequently recognized by the salivary IgA antibody of our study population despite the presence of infection. Some epitopes of AgI/II have been shown to be cross-reactive to human IgG domains, and several commensal species of the oral cavity, e.g., *S. sanguinis* and *Streptococcus oralis*, produce homologues that share 57 to 73% of identity to AgI/II.

Associations between the specificity of secreted IgA to initial acquisition of bacterial pathogens of the mucosae suggest the role of mucosal immunity in regulating the persistence of pathogens of the nasopharynx (12, 13, 41). For example, a peak of immune response to a potential vaccine target of *H. influenzae*, the outer membrane protein P6 (29), was detected early in life (1 to 24 months) among children with short persistence of colonization, while low response to P6 occurred in children colonized for several distinct strains during extended periods (12). Persistent and recurrent colonization by nontypeable *H. influenzae* strains in otitis-prone children was also associated to a poor local immune response to P6 (41). The reasons for the differences in patterns of early response to GbpB remain to be determined, and one hypothesis is that distinct haplotypes of major histocompatibility complex class II may be related to variations in the presentation of functionally important and immunogenic GbpB epitopes to Th cells. Bioinformatic analysis of GbpB sequence has revealed several peptides of putative high binding affinity to distinct human major histocompatibility complex class II alleles, and at least one of these peptides has shown remarkable protective effects in caries vaccine experiments in animal models (32).

ACKNOWLEDGMENTS

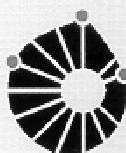
This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant 02/07156-1, and grant 04/07425-8 to R.D.N. R.O.M.-G. was also supported by CAPES (ProDoc, grant 029/03).

REFERENCES

- Bammann, L. L., and R. J. Gibbons. 1979. Immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mutans* in saliva of adults, children, and predentate infants. *J. Clin. Microbiol.* 10:538-543.
- Banas, J. A., and M. M. Vickerman. 2003. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14:89-99.
- Bowen, W. H., K. Schilling, E. Giertsen, S. Pearson, S. F. Lee, A. Bleiweis, and D. Beeman. 1991. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. *Infect. Immun.* 59:4606-4609.
- Bratthall, D., R. Serinirach, K. Hamberg, and L. Widerstrom. 1997. Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* 12:212-218.
- Camling, E., and B. Kohler. 1987. Infection with the bacterium *Streptococcus mutans* and salivary IgA antibodies in mothers and their children. *Arch. Oral Biol.* 32:817-823.
- Caulfield, P. W., G. R. Cutter, and A. P. Dasanayake. 1993. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J. Dent. Res.* 72:37-45.
- Caulfield, P. W., A. P. Dasanayake, Y. Li, Y. Pan, J. Hsu, and J. M. Hardin. 2000. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect. Immun.* 68:4018-4023.
- Chia, J. S., L. Y. Chang, C. T. Shun, Y. Y. Chang, Y. G. Tsay, and J. Y. Chen. 2001. A 60-kilodalton immunodominant glycoprotein is essential for cell wall integrity and the maintenance of cell shape in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 69:6987-6998.
- Childers, N. K., C. Greenleaf, F. Li, A. P. Dasanayake, W. D. Powell, and S. M. Michalek. 2003. Effect of age on immunoglobulin A subclass distribution in human parotid saliva. *Oral Microbiol. Immunol.* 18:298-301.
- Childers, N. K., G. Tong, S. Mitchell, K. Kirk, M. W. Russell, and S. M. Michalek. 1999. A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a *Streptococcus mutans* antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses. *Infect. Immun.* 67:618-623.
- Cole, M. F., S. Bryan, M. K. Evans, C. L. Pearce, M. J. Sheridan, P. A. Sura, R. Wientzen, and G. H. Bowden. 1998. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary antibodies reactive with *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 during colonization. *Infect. Immun.* 66:4283-4289.
- Faden, H., L. Duffy, A. Williams, D. A. Krystofik, and J. Wolf. 1995. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. *J. Infect. Dis.* 172:132-135.
- Faden, H., Y. Harabuchi, and J. J. Hong. 1994. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media. *J. Infect. Dis.* 169:1312-1317.
- Gahnberg, L., D. J. Smith, M. A. Taubman, and J. L. Ebersole. 1985. Salivary-IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. *Arch. Oral Biol.* 30:551-556.
- Gray, B. M., G. M. Converse III, and H. C. Dillon, Jr. 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* 142:923-933.
- Hajishengallis, G., and S. M. Michalek. 1999. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol. Immunol.* 14:1-20.
- Klein, M. I., F. M. Florio, A. C. Pereira, J. F. Hoffing, and R. B. Gonçalves. 2004. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J. Clin. Microbiol.* 42:4620-4626.
- Koga, T., T. Oho, Y. Shimazaki, and Y. Nakano. 2002. Immunization against dental caries. *Vaccine* 20:2027-2044.
- Kohler, B., L. Andreen, and B. Jonsson. 1988. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. *Oral Microbiol. Immunol.* 3:14-17.
- Kohler, B., and D. Bratthall. 1979. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *J. Clin. Microbiol.* 9:584-588.
- Lee, S. F., A. Prognulske-Fox, and A. S. Bleiweis. 1988. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P1 (I/II), in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56:2114-2119.
- Li, Y., and P. W. Caulfield. 1995. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J. Dent. Res.* 74:681-685.
- Mattos-Graner, R. O., M. S. Correa, M. R. Latorre, R. C. Peres, and M. P. Mayer. 2001. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. *J. Public Health Dent.* 61:161-167.
- Mattos-Graner, R. O., S. Jin, W. F. King, T. Chen, D. J. Smith, and M. J. Duncan. 2001. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect. Immun.* 69:6931-6941.
- Mattos-Graner, R. O., Y. Li, P. W. Caulfield, M. Duncan, and D. J. Smith. 2001. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J. Clin. Microbiol.* 39:2313-2316.
- Mattos-Graner, R. O., M. H. Napimoga, K. Fukushima, M. J. Duncan, and D. J. Smith. 2004. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 42:4586-4592.
- Mattos-Graner, R. O., F. Zelante, R. C. Line, and M. P. Mayer. 1998. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res.* 32:319-323.
- Milgrom, P., C. A. Riedy, P. Weinstein, A. C. Tanner, L. Manibusan, and J. Bruss. 2000. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hyp-

- oplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 28:295-306.
29. Sabirov, A., S. Kodama, T. Hirano, M. Suzuki, and G. Mogi. 2001. Intranasal immunization enhances clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* and reduces stimulation of tumor necrosis factor alpha production in the murine model of otitis media. *Infect. Immun.* 69:2964-2971.
 30. Smith, D. J., H. Akita, W. F. King, and M. A. Taubman. 1994. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 62:2545-2552.
 31. Smith, D. J., W. F. King, H. Akita, and M. A. Taubman. 1998. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol. Immunol.* 13:278-285.
 32. Smith, D. J., W. F. King, L. A. Barnes, Z. Peacock, and M. A. Taubman. 2003. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein B. *Infect. Immun.* 71:1179-1184.
 33. Smith, D. J., W. F. King, J. V. Gilbert, and M. A. Taubman. 1998. Structural integrity of infant salivary immunoglobulin A (IgA) in IgA1 protease-rich environments. *Oral Microbiol. Immunol.* 13:89-96.
 34. Smith, D. J., W. F. King, and M. A. Taubman. 1990. Salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens in preeruptive infants. *Oral Microbiol. Immunol.* 5:57-62.
 35. Smith, D. J., B. Shoushtari, R. L. Heschel, W. F. King, and M. A. Taubman. 1997. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic subdomain of mutans group streptococcal glucosyltransferase. *Infect. Immun.* 65:4424-4430.
 36. Smith, D. J., and M. A. Taubman. 1990. Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of mutans streptococci. *J. Clin. Immunol.* 10:273-281.
 37. Smith, D. J., and M. A. Taubman. 1992. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 3:109-133.
 38. Smith, D. J., and M. A. Taubman. 1996. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. *Infect. Immun.* 64:3069-3073.
 39. Smith, D. J., and M. A. Taubman. 1997. Vaccines against dental caries infection, p. 913-920. *In* M. M. Levine, G. C. Woodrow, J. B. Kaper, and G. S. Cobon (ed.), *New generation vaccines*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
 40. van Houte, J., G. Gibbs, and C. Butera. 1982. Oral flora of children with "nursing bottle caries." *J. Dent. Res.* 61:382-385.
 41. Yamanaka, N., and H. Faden. 1993. Antibody response to outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis-prone children. *J. Pediatr.* 122:212-218.
 42. Yamashita, Y., W. H. Bowen, R. A. Burne, and H. K. Kuramitsu. 1993. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* 61:3811-3817.

Editor: J. D. Clements



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Análise da resposta imunológica de crianças durante colonização por *Streptococcus mutans* e dos fatores genético-moleculares envolvidos na formação do biofilme dental por estes microrganismos", sob o protocolo nº **110/2002**, da Pesquisadora Responsável **Renata de Oliveira Mattos-Graner**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.

Piracicaba, 26 de novembro de 2002

We certify that the research project with title "Analysis of the immune response of children during *Streptococcus mutans* colonization and of the molecular-genetic mechanisms involved in the biofilm formation by these microorganisms", protocol nº **110/2002**, by Researcher responsibility by **Renata de Oliveira Mattos-Graner**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, November 26 2002

Pedro Luiz Rosalen
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP

Antonio Bento Alves de Moraes
Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Anexo 3

Imunidade de crianças altamente expostas a *Streptococcus mutans*

Immunity of children heavily exposed to *S. mutans*

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dr. Renata O. Mattos Graner

RG:19626648-8

CPF:175752488 62

Endereço: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

Área de Microbiologia e Imunologia

Av. Limeira, 901

CEP 13414-018 Piracicaba, SP, Brasil

Telefone: 55 19 3412 5379

Fax: 55 19 3412 5218

Dr. Daniel J. Smith

Endereço: The Forsyth Institute

Department of Immunology

140 The Fenway

Boston, MA 02115

Telefone: 1 617 262 5200

Fax: 1 617 456 0742

**Termo de informação e consentimento para a participação
em pesquisa clínica**

Título:

Análise da resposta imunológica de crianças durante colonização por *Streptococcus mutans* e dos fatores genético-moleculares envolvidos na formação do biofilme dental por estes microrganismos.

Pesquisadores:

Daniel J. Smith
Renata de Oliveira Mattos-Graner
Alessandra Castro Alves
Maria do Rosário de O. Latorre
Ruchelle Dias Nogueira

Este termo contém as informações sobre a pesquisa na qual você e seu (ua) filho (a) poderão participar. **Por favor, leia-o atentamente.** Qualquer dúvida que tiver, esclareça-a com a pesquisadora responsável, a qual estará a sua inteira disposição. Você deve decidir se deseja ou não participar desta pesquisa após entender todos os aspectos descritos a seguir, de modo que possa tomar uma decisão consciente.

1) Objetivo:

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o potencial de resposta imunológica de crianças entre 6 e 24 meses de idade contra uma bactéria que causa a cárie dental, denominada *Streptococcus mutans*. Pretende-se também identificar possíveis fatores bacterianos relacionados com a capacidade destes microrganismos de se estabelecer na boca.

2) Justificativas:

A cárie dental é uma doença infecciosa, cujo tratamento sintomático restaurador é extremamente caro. A maior parte dos recursos públicos e privados ainda é aplicada em procedimentos curativo-restauradores e pouca ênfase é dada ao avanço de estratégias preventivas de controle desta doença. *Streptococcus mutans* são os principais microrganismos envolvidos no desenvolvimento da cárie dental porque reúnem um grupo de fatores de virulência. Busca-se com este estudo compreender a participação de alguns destes fatores na capacidade destas bactérias de se acumularem nas superfícies dos dentes. Procura-se também avaliar a capacidade de defesa das crianças contra estas bactérias durante os processos de infecção. Assim, teremos maiores dados para o desenvolvimento de estratégias de controle de infecção que possam ser aplicados em programas de saúde pública.

3) Descrição da pesquisa:

Participarão deste trabalho 100 crianças com idade inicial de 6 meses, as quais serão acompanhadas até atingirem 24 meses de idade. As crianças serão submetidas ao exame bucal por um odontopediatra quando será feita a coleta de saliva com uma pipeta plástica descartável e esterilizada. Amostras bucais para cultura bacteriana serão coletadas com uma espátula de madeira esterilizada, a qual será introduzida na boca e girada até que umedecida com saliva. Este material será utilizado nesta pesquisa ou em pesquisas futuras relacionadas. As mães das crianças

participantes também serão entrevistadas para a obtenção de informações adicionais sobre seus(uas) filhos(as).

5) Desconfortos, riscos e benefícios esperados:

As crianças que participarem da pesquisa serão examinadas após escovação dental apenas com espelho intrabucal após a secagem com gaze dos dentes eventualmente presentes. A saliva para estudo microbiológico será coletada com uma espátula de madeira esterilizada e descartável, a qual será introduzida na boca até que umedecida com saliva, procedimento este que causa mínimo desconforto. Não existem riscos adicionais. As mães serão entrevistadas nos dias que comparecerem para as reuniões de rotina das creches-escolas públicas em entrevistas com as próprias agentes de saúde destas instituições. Os benefícios serão os conhecimentos gerados por esta pesquisa e o diagnóstico precoce de possíveis problemas bucais, o qual será transmitido às mães e agentes de saúde.

6) Alternativas:

Não existem métodos alternativos para a obtenção das informações necessárias.

7) Exclusões:

Serão excluídas das pesquisas, as crianças com problemas de saúde geral ou sob antibioticoterapia até duas semanas antes do dia do exame.

8) Compensação:

Não há previsão de indenização ou ressarcimento, pois não existirão gastos ou riscos relacionados exclusivamente com a pesquisa.

9) Confidencialidade dos registros:

Você e seu filho terão direito à privacidade, visto que todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e laboratoriais permanecerão confidenciais nos âmbitos possíveis da lei, assegurando a proteção da sua imagem. Serão respeitados seus valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. A menos que a revelação seja exigida por ação legal ou regulatória, todos os esforços serão feitos para protegê-los, a você e a seu(u) filho(a), de serem identificados pessoalmente. Como participante desta pesquisa, você terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da comissão de ética responsável. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, porém sua identidade não será divulgada.

10) Direito de participar, recusar ou sair:

Sua participação é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou mesmo interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perdas de seus benefícios aos quais de outra forma tenha direito. Os pesquisadores terão o direito de desligá-lo do estudo a qualquer momento, se julgarem necessário. Ao participar, você concorda em cooperar com a pesquisa, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

11) Contatos:

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas com o pesquisador responsável, Dra. Renata de O. Mattos-Graner (019) 3412 5287 e Profa. Sueli Aparecida de Araújo Pereira, responsável pelo projeto junto ao Setor de Saúde Escolar da Secretaria da Educação do município de Piracicaba pelo telefone (19) 3435 5555.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Tendo compreendido o termo de informação e consentimento para a participação da pesquisa clínica intitulada "**Análise da resposta imunológica de crianças durante colonização por *Streptococcus mutans* e dos fatores genético-moleculares envolvidos na formação do biofilme dental por estes microrganismos**", autorizo a participação de meu (minha) filho(a), _____, bem como concordo em participar deste estudo. Sei que nossa participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidades e sem perder os benefícios oferecidos pelas creches escolas públicas do município de Piracicaba. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores envolvidos para a publicação em revistas científicas e apresentação em congressos.

Recebi uma cópia do termo de consentimento.

(Não assine este termo caso não tenha tido oportunidade de esclarecer suas dúvidas ou não tenha recebido respostas satisfatórias a todas elas).

Piracicaba, _____ de _____ de _____.

Assinatura da mãe
RG: _____.

Dra. Renata de O. Mattos-Graner
Pesquisadora responsável
RG. 19626648-8

Profa. Sueli Aparecida de Araújo Pereira
Coordenadora do Programa de Educação e Saúde
Prefeitura de Piracicaba, SP
RG.6.612.768

QUESTIONÁRIO

Anexo 4

Creche: _____ Data: _____ N^o. ficha: _____

Nome da Criança de 6 a 12 meses: _____

Data nasc.: ____/____/____ Sexo: () F () M

Nome de irmãos (as): _____ idade(s): _____

Nome mãe ou responsável: _____ Data nasc.: ____/____/____

1) Grau de instrução da mãe:

- 0. () sem instrução
- 1. () primeiro grau completo
- 2. () primeiro grau incompleto
- 3. () segundo grau completo
- 4. () segundo grau incompleto
- 5. () superior

2) Renda familiar: _____ reais

3) Perfil racial: Você se considera

- 1. () branco
- 2. () negro
- 3. () mulato
- 4. () amarelo
- 5. () índio
- 6. () outros _____

4) Qual o peso do seu (ua) filho (a) quando nasceu? _____.

5) Amamenta ou amamentou seu filho(a)? () Sim () Não

6) Até que idade (meses) seu(ua) filho(a) mamou no peito? _____.

7) Quantas vezes por dia seu filho(a) é (foi) amamentado? _____.

8) Durante a noite, você amamenta ou amamentava seu(ua) filho(a)

- 1. () nunca
- 2. () antes da hora de dormir
- 3. () várias vezes durante a noite. Quantas vezes por noite? _____.

9) Seu(ua) filho(a) toma mamadeira durante o dia? () Sim () Não

10) Se não toma, até que idade (meses) tomou mamadeira durante o dia? _____

11) Se ainda toma mamadeira, quantas vezes por dia? _____

12) Qual a receita da mamadeira que seu(ua) filho(a) toma durante o dia ? _____

13) Seu(ua) filho(a) toma mamadeira à noite ? () Sim () Não

14) Qual a receita da mamadeira que você oferece ao seu(ua) filho (a) à noite? _____

15) Durante a noite, seu(ua) filho(a) toma mamadeira:

- a. () no colo, antes de dormir
- b. () ele/ela dorme com a mamadeira na cama

c. () ele/ela acorda várias vezes à noite para receber mamadeira que você oferece.
Quantas vezes por noite? _____
Qual a duração das mamadas? _____

- 16) Quando seu filho(a) começou a comer comida salgada? _____
17) O que o seu(ua) filho(a) comeu ontem, desde o momento que deixou a creche até esta manhã quando voltou? _____
18) Seu(ua) filho(a) tem algum problema de saúde? () Sim () Não

Se sim, qual? _____

- 19) Seu(ua) filho(a) está tomando algum medicamento? () Sim () Não

Se sim, qual? _____

20) Seu(ua) filho(a) está com alguns dos seguintes problemas de saúde?

1. () asma
2. () pneumonia
3. () outros problemas respiratórios. Quais? _____
4. () inflamação / dor de garganta (faringite)
5. () inflamação no ouvido (otite)
6. () febre reumática
7. () desnutrição
8. () doenças de infância (sarampo, catapora, rubéola). Qual? _____
9. () outros. Quais? _____

21) Seu filho(a) está tomando algum antibiótico? Qual? Há quanto tempo? Quantas vezes por dia? _____

22) Quais os medicamentos que seu(ua) filho(a) já tomou? Por que? _____

23) Qual a frequência de alguns desses sintomas para o seu(ua) filho(a)?

- Nariz escorrendo: () nunca () algumas vezes () muito frequente () todo tempo
- Tosse: () nunca () algumas vezes () muito frequente () todo tempo
- Nariz entupido/ respira pela boca () nunca () algumas vezes () muito frequente () todo tempo
- Garganta inflamada: () nunca () algumas vezes () muito frequente () todo tempo

24) Seu(ua) filho(a) usa chupeta?

1. () não
2. () a toda hora
3. () às vezes. Mais ou menos, quantas vezes ao dia? _____
4. () só para dormir

25) Seu(ua) filho(a) costuma morder ou chupar algum objeto além da chupeta?

1. () não
2. () sim. Qual objeto e com que frequência? _____