

UNIVERSIDADE DE UBERABA
JULIANA BARBOSA DE FARIA

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *Candida albicans* e
Streptococcus mutans NA PRESENÇA DE COLOSTRO HUMANO:
INFLUÊNCIA DA 3' SIALOLACTOSE NA BIOMASSA MICROBIANA**

Uberaba, MG

2016

JULIANA BARBOSA DE FARIA

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* NA PRESENÇA DE COLOSTRO HUMANO: INFLUÊNCIA DA 3' SIALOLACTOSE NA BIOMASSA MICROBIANA

Dissertação apresentada para Defesa de Mestrado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Biopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins

Uberaba, MG

2016

JULIANA BARBOSA DE FARIA


"AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *Candida Albicans* e *Streptococcus Mutans* NA PRESENÇA DE COLOSTRO HUMANO: INFLUÊNCIA DA 3' SIALOLACTOSE NA BIOMASSA MICROBIANA"

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

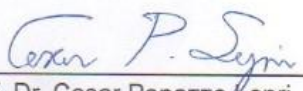
Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 14/12/2016

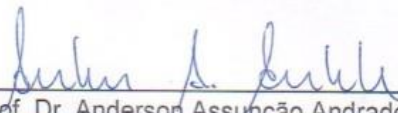
BANCA EXAMINADORA:



Profª. Drª. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins
Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

DEDICATÓRIA

A Deus, meu refúgio, minha força, minha fé para lutar sempre e buscar meus objetivos.

Ao meu esposo Helton e meu filho Mateus, que, com todo carinho, tiveram paciência nos momentos de ausência e estudo do mestrado. Joias preciosas, que Deus colocou em minha vida, para preenchê-la de muito amor e carinho.

Aos meus pais Alfredo Júlio e Joana Aparecida, pelo amor infinito, pelo apoio constante, pelos ensinamentos, por serem a base de tudo que sou.

Ao meu irmão, companheiro e amigo, Alfredo Júnior, pelo amor, apoio, carinho e torcida.

Ao tio Marcos, amigo e companheiro, pelo carinho e orações, por cuidar tão bem de meus pais nos momentos de ausência.

Ao meu sogro, Márcio e meus cunhados Juliano, José Edmar e Renato, pelo apoio de sempre.

Aos primos Rogério, Viviane, Jairo e Renata pelo incentivo aos estudos e apoio de sempre.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Professora Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, minha eterna gratidão pela amizade, pelos ensinamentos, confiança, pelas oportunidades de mudança, pelo incentivo, pelo apoio, pelos conselhos e paciência.

Ao Coordenador do Mestrado em Odontologia, Cesar Penazzo Lepri, minha eterna gratidão pela confiança e por acreditar que eu era capaz de alcançar meus objetivos, pela oportunidade, incentivo e amizade.

Aos professores da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Dr. Anderson Assunção Andrade e Dra. Aline Dias Paiva, pela confiança e disponibilidade em avaliar meu trabalho.

Aos professores e diretores do Curso de Direito da Uniube, principalmente Andrea Fabri e Eduardo Azank, que me incentivaram e acreditaram no meu potencial.

Ao professor Geraldo Thedei Junior, pelas primeiras orientações, para que eu chegasse até aqui.

Aos funcionários do setor de Recursos Humanos da Uniube, Viviane e Lucas, que me acolheram tão bem e me fizeram acreditar.

Muito obrigada por tudo! Serei eternamente grata!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos criou e foi criativo nesta tarefa. Seu fôlego de vida em mim, me sustentou e deu coragem para lutar e propor sempre um mundo novo de possibilidades.

À Universidade de Uberaba, por meio do Reitor Prof. Dr. Marcelo Palmério.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão, por meio do Pró-Reitor, Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores do Mestrado em Odontologia, minha eterna gratidão pelo apoio, pela amizade, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao professor João Paulo Steffens, meu primeiro orientador, pelos ensinamentos e confiança.

Aos colegas do curso de Mestrado em Odontologia da 10ª Turma - Biopatologia: Camilla Beatriz, Leonardo Gaia, Maiza Segatto, Mariana Pacífico, Michele Gomides, Neidy Saramago, Paula Bandeira.

A meus amigos do laboratório Erika Vallim, Rodolfo, Eleonora, Isabella, Raphaela, Rayane, Marcelly e Maralice, pela colaboração nos procedimentos laboratoriais, pela amizade e os bons momentos que passamos juntos.

À aluna de Iniciação Científica, Marcela Beraldo, minha querida amiga, pela colaboração nos procedimentos laboratoriais, pelo carinho, pela torcida, pela amizade e momentos de vitória que passamos juntas.

À Albertina, minha primeira professora de Português, pela correção gramatical e pelo apoio inconstante.

À secretaria do curso de pós-graduação e extensão, em especial à secretária do Mestrado em Odontologia, Flávia Michele da Silva, pela amizade e prontidão em atender.

A todos os funcionários da Universidade de Uberaba, agradeço a amizade e o trabalho executado.

À minha família, que foi meu sustento e força para continuar os estudos, principalmente minha madrinha e padrinho, Isabel Fernandes e Antônio Fernandes, que estiveram presentes nos momentos mais brilhantes da minha vida.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação pudesse ser realizada.

Enfim, a todos, o meu muito obrigada!

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir.

Augusto Cury

FARIA, J.B. **Avaliação da formação do biofilme de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em presença de colostro humano: Influência da 3' Sialolactose na biomassa microbiana.** 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2016.

RESUMO

A cavidade bucal é a principal porta de entrada de inúmeros micro-organismos, sendo que alguns podem formar biofilmes e causar doenças. A organização em biofilmes representa o maior desafio para a ação antimicrobiana e inúmeros estudos buscam formas de controle do seu desenvolvimento. O aleitamento materno representa uma importante fonte nutricional e imunológica para o neonato, que está em um momento crítico para a aquisição de processos infecciosos, pois o seu sistema imunológico de mucosas está em desenvolvimento. O colostro possui inúmeros componentes de defesa como a 3' Sialolactose que é um oligossacarídeo que parece ter uma atividade antimicrobiana. Há controvérsias que precisam ser investigadas sobre a influência do colostro (C) na formação de biofilmes orais, como os formados pela *Candida albicans* (CA) e *Streptococcus mutans* (SM) que são os agentes etiológicos primários de doenças orais comuns na infância, como a Cândidos oral e cárie respectivamente. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a adesão inicial e a biomassa formada de biofilme de SM e CA em presença de (C) com ou sem saliva (S) e 3' Sialolactose (SI). Para tanto, 30 amostras de colostro e de saliva de recém-nascidos de indivíduos de boa saúde geral e oral foram coletadas após o parto. Os ensaios foram divididos em grupos que receberam o colostro antes (C-A), durante (C-DU) e após 24 horas (C-DE) da aplicação da cultura microbiana. Também foram testadas a aplicação da saliva somente (S-A) e em conjunto com o colostro (C+S-A) antes da formação do biofilme. Já os grupos com 3' Sialolactose receberam o oligossacarídeo em duas concentrações antes (SI-A), durante (SI-DU) e depois (SI-DE) do inóculo microbiano. Estes grupos experimentais foram comparados com biofilmes de 24h (B24h) e de 48h (B48h). Os biofilmes foram desenvolvidos em placas estéreis de 96 poços com culturas frescas de 24 horas incubadas a 37° C. Os biofilmes formados foram fixados com formaldeído a 10% e posteriormente corados com cristal violeta a 0,1%. Após lavagem com água destilada, ressuspensão e eluição com álcool absoluto, as densidades ópticas foram mensuradas a 490 nm em espectrofotômetro digital. As comparações da quantidade de biomassa formada foram comparadas e analisadas por ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As frequências de amostras que aumentaram ou diminuíram os biofilmes foram comparadas entre os grupos e foi empregado o teste do Qui-Quadrado e teste Exato de Fisher. Utilizou-se o teste de Correlação de Pearson para comparar os grupos do estudo. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados dos ensaios de biofilme de SM mostraram que no grupo SM-C-A, em que o colostro foi aplicado antes, formou biofilme de mesma quantidade que no controle ($p > 0,05$). Por outro lado, nos grupos em que os colostros foram aplicados concomitante ou após o SM (grupos SM-C-DU

e SM-C-DE) houve uma redução significativa da DO obtida ($p < 0,05$). A presença de saliva aumentou a biomassa do biofilme de SM ($p < 0,05$). Os resultados dos biofilmes de CA mostraram que o biofilme formado nos grupos CA-C-A e CA-C-DE não foram diferentes dos controles ($p < 0,05$), mas quando o colostro foi aplicado na presença de saliva (CA-S-A), a DO dos biofilmes foi menor estatisticamente que das obtidas nos grupos controles ($p < 0,05$). A aplicação de Sialolactose reduziu a formação do biofilme de SM e CA, tanto no SM-SI-A-10 e SM-SI-A-20 quanto no SM-SI-DU-20 ($p < 0,05$). O presente estudo permitiu concluir que a saliva ajudou a proliferação do biofilme de SM e que o colostro não impediu a adesão inicial de SM, mas interferiu no acúmulo e desenvolvimento dos microorganismos em biofilmes. Os resultados dos ensaios de CA permitiram concluir que o colostro não altera a adesão e nem mesmo o crescimento de CA, mas a saliva reduz a densidade da biomassa fúngica. A 3' Sialolactose interfere na adesão e crescimento tanto no biofilme de CA como de SM, sendo um importante componente do colostro com atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Cárie, *Candida albicans*, candidose, Colostro, *Streptococcus mutans*.

Faria, J.B. **Evaluation of Biofilm Formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in presence of human colostrum: Influence of 3' Sialolactosis in the microbial biomass.** 2016. Dissertation (Master in Dentistry) University of Uberaba, Uberaba, 2016.

ABSTRACT

The oral cavity is the main gateway to several microorganisms, some of which may form biofilms and cause disease. The organization in biofilms represents the greatest challenge for the antimicrobial action and numerous studies are looking for ways to control its development. Breastfeeding represents an important nutritional and immunological source for the neonate, who is susceptible to acquisition of infectious processes because their mucosal immune system is under development. Colostrum has numerous defense components such as 3' Sialolactose which is an oligosaccharide that appears to have antimicrobial activity. There are controversies that need to be investigated about the influence of colostrum (C) on the formation of oral biofilms, such as those formed by *Candida albicans* (CA) and *Streptococcus mutans* (SM), which are the primary etiological agents of common oral diseases in childhood, such as Oral candidiasis and tooth decay respectively. The objective of the present study was to evaluate *in vitro* the initial adhesion and biomass formed of SM and CA biofilm in presence of C with or without saliva (S) and 3' Sialolactose (SI). To that end, 30 samples of colostrum and saliva of newborns from individuals of good general and oral health were collected after childbirth. The assays were divided into groups that received colostrum before (C-A), during (C-DU) and after 24 hours (C-DE) from application of microbial culture. The application of saliva only (S-A) and in conjunction with colostrum (C + S-A) before biofilm formation were also tested. The 3' Sialolactose groups received the oligosaccharide at two concentrations before (SI-A), during (SI-DU) and after (SI-DE) the microbial inoculum. These experimental groups were compared with 24h (B24h) and 48h (B48h) biofilms. The biofilms were grown in sterile 96-well plates with 24-hour fresh cultures incubated at 37°C. The biofilms formed were fixed with 10% formaldehyde and then stained with 0.1% crystal violet. After washing with distilled water, resuspension and absolute alcohol elution, the optical densities were measured at 490 nm in a digital spectrophotometer. Comparisons of the amount of biomass formed were compared and analyzed by ANOVA followed by the Bonferroni post-test. The frequencies of samples that increased or decreased biofilms were compared between the groups and the Chi-Square test and the Fisher's exact test were used. The Pearson's correlation test was used to compare the study groups. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The results of the SM biofilm tests showed that in the SM-C-A group, in which colostrum was applied before, it formed a biofilm of the same amount as the control ($p > 0.05$). On the other hand, in groups in which colostrums were applied concomitantly or after SM (SM-C-DU and SM-C-DE groups) there was a significant reduction in OD obtained ($p < 0.05$). The presence of saliva increased the biofilm biomass of

SM ($p < 0.05$). The results of CA biofilms showed that the biofilm formed in the CA-C-A and CA-C-DE groups were not different from the controls ($p < 0.05$), but when the colostrum was applied In the presence of saliva (CA-S-A), the OD of the biofilms was statistically lower than those obtained in the control groups ($p < 0.05$). The application of Sialolactose reduced SM and CA biofilm formation in both SM-SI-A-10, SM-SI-A-20 and SM-SI-DU-20 ($p < 0.05$). The present study allowed to conclude that saliva helped the proliferation of SM biofilm and that colostrum did not prevent the initial adhesion of SM, but interfered in the accumulation and development of microorganisms in biofilms. The results of the CA trials allowed us to conclude that colostrum does not alter the adhesion or even growth of CA, but saliva reduces the density of fungal biomass. 3' Sialolactose interferes with adhesion and growth in both CA and SM biofilms, being an important component of colostrum with antimicrobial activity.

Key words: Caries, *Candida albicans*, Colostrum, *Streptococcus mutans*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que o colostro foi aplicado antes (SM-C-A), durante a inoculação microbiana (SM-C-DU) e comparado com biofilme de SM de 24 horas (SM-B24h) 26
- Figura 2.** Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que o colostro foi aplicado após 24 horas da inoculação microbiana (SM-C-DE) e comparado com biofilme de SM de 48 horas (SM-B48h) 27
- Figura 3.** Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que o colostro (SM-C-A), a saliva (SM-S-A) e colostro e saliva ao mesmo tempo (SM-C+S-A) foram aplicados antes da inoculação microbiana e o biofilme de SM de 24 horas (SM-B24h) 28
- Figura 4.** Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em que o colostro foi aplicado antes (CA-C-A), durante a inoculação microbiana (CA-C-DU) e comparado com biofilme de CA de 24 horas (CA-B24h) 30
- Figura 5.** Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em que o colostro foi aplicado após 48 horas da inoculação microbiana (CA-C-DE) e comparado com biofilme de CA de 48 horas (CA-B48h) 31
- Figura 6.** Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em que a saliva (CA-S-A) e colostro e saliva ao mesmo tempo (CA-C+S-A) foram aplicados antes da inoculação microbiana e o biofilme de CA de 24 horas (SM-B24h) 32
- Figura 7.** Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que a 3' Sialolactose foi aplicada antes (SM-SI-A-10 e SM-SI-A-20), durante a inoculação microbiana (SM-SI-DU-10 e SM-SI-DU-20) e comparado com biofilme de SM de 24 horas (SM-B24h) 34
- Figura 8.** Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que a 3' Sialolactose foi aplicada após 48 horas da inoculação microbiana (SM-SI-DE-10 e SM-SI-DE-20) e comparado com biofilme de SM de 48 horas (SM-B48h) 35
- Figura 9.** Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em que a 3' Sialolactose foi aplicada antes (CA-SI-A-10 e CA-SI-A-20), durante a inoculação microbiana (CA-SI-DU-10 e CA-SI-DU-20) e comparado com biofilme de CA de 24 horas (CA-B24h) 36
- Figura 10.** Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em que a 3' Sialolactose foi aplicada após 48 horas da inoculação microbiana (CA-SI-DE-10 e CA-SI-DE-20) e comparado com biofilme de CA de 48 horas (CA-B48h) 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela 1. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que o colostro (SM-C-A), (SM-C-DU), (SM-C-DE), colostro e saliva ao mesmo tempo (SM-C+S-A) e saliva (SM-S-A) foram aplicados antes da inoculação microbiana e os biofilmes de SM de 24 horas (SM-B24h) e 48 horas (SM-B48h). 29

Tabela 2. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em que o colostro (CA-C-A), (CA-C-DU), (CA-C-DE), a saliva (CA-S-A) e colostro e saliva ao mesmo tempo (CA-C+S-A) foram aplicados antes da inoculação microbiana e o biofilme de CA de 24 horas (CA-B24h). 33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag I/II: Antígeno I/II

ANOVA: Análise de Variância

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Brain Heart Infusion

CA: *Candida albicans*.

C: Colostro humano

DO: Densidade óptica

DP: Desvio padrão

EDTA: Etilenodiaminotetracético.

et al: e colaboradores

Gtf: Glicosiltransferase

GbpB: Glucan Binding Protein B

h: horas

IgAs: Imunoglobulina A secretora

MATER HC-FMRP: Centro de Referência em Saúde da Mulher do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

mg: miligrama

n: número de amostras

p: nível de significância

pH: logaritmo negativo de concentração hidrogeniônica ($-\log[H^+]$)

q: valores da amplitude total estudentizada

S: Saliva

SI: Sialolactose

SM: *Streptococcus mutans*.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TSB: Tryptic Soy Broth

UNIUBE: Universidade de Uberaba.

°C: grau Celsius.

mL: Mililitro(s)

µL: Microlitro(s)

mM: Milimolar.

nm: Nanômetro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE	21
3	OBJETIVOS	
	3.1. Geral	21
	3.2. Específicos	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
	4.1. Delineamento Experimental	21
	4.2. Coleta e Armazenamento Amostral	22
	4.3. Seleção das cepas microbianas e meios de cultura	22
	4.4. Condições de crescimento e cultivo microbiano	23
	4.5. Grupos de estudo e tempo de aplicação das amostras	23
	4.6. Formação do biofilme microbiano	24
	4.6.1 <i>Fixação e coloração do biofilme microbiano</i>	24
	4.7. Análise dos Resultados e Estatísticas	24
5	RESULTADOS	25
	5.1 Influência das amostras testadas na formação de biofilme de SM	25
	5.2 Influência das amostras testadas na formação de biofilme de CA	29
	5.3 Influência da 3' Sialolactose testadas na formação de biofilme de CA e SM	33
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	48
	ANEXO B – QUESTIONÁRIO	49

1 1. INTRODUÇÃO

2 A colonização oral do recém-nascido inicia-se a partir do nascimento, quando a criança
3 recebe micro-organismos provenientes do canal do parto ou pelo contato com as pessoas e o
4 ambiente (BRANDTZAEG, 2003). A cavidade oral é a via primária de entrada de vários micro-
5 organismos (BERKOWITZ *et al.*, 1980). Alguns destes, embora passem pelas mucosas, não
6 são capazes de colonizá-las (SMITH & TAUBMAN, 1992). No entanto, outros se tornam
7 residentes das superfícies mucosas, modificando-a e permitindo o estabelecimento de novos
8 micro-organismos, formando comunidades microbianas complexas denominadas de biofilmes
9 (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

10 Biofilmes são derivados microbiológicos de comunidades sésseis caracterizados por
11 células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato ou uma interface ou uma à outra
12 (ZIJNGE *et al.*, 2010) contendo uma ampla variedade de espécies que interagem entre si
13 (SHIRTLIFF *et al.*, 2009; THEIN *et al.*, 2009) e são incorporados numa matriz de substâncias
14 poliméricas extracelulares (DONLAN & COSTERTON, 2002). A cavidade bucal é colonizada
15 por diferentes espécies microbianas que se encontram organizadas em biofilmes (JAROSZ *et*
16 *al.*, 2009). Alguns biofilmes microbianos contribuem para a causa de doenças humanas
17 (FALSETTA *et al.*, 2014), como, por exemplo, a Candidose e a Cárie, que são doenças orais
18 comuns na infância e que têm como agentes etiológicos *Candida albicans* (CA) e *Streptococcus*
19 *mutans* (SM) respectivamente.

20 A cárie é uma doença infecto contagiosa de caráter crônico, multifatorial causada pelo
21 processo de desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da
22 fermentação dos carboidratos da dieta pelas bactérias, especialmente de SM (SELWITZ *et al.*,
23 2007). Estas bactérias que se aderem e se acumulam em superfícies, sobre uma camada de
24 proteína denominada película, que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas,
25 lipídeos e componentes do fluido gengival.

26 Em relação à cárie vários fatores de virulência são associados com a progressão da
27 doença, como degradação da hidroxiapatita, a formação de biofilme, adesão a hidroxiapatita,
28 produção de ácido e tolerância ao ácido (JALASVUORI *et al.*, 2012).

29 *Streptococcus mutans* possuem a capacidade de produzir ácidos (acidogênese) em
30 combinação com um crescimento a um pH baixo (aciduricidade) que são considerados como
31 sendo dois dos fatores de virulência importantes relacionados com a cárie dentária (COTTER &
32 HILL, 2003).

33 O desenvolvimento do biofilme de SM pode ser dividido em vários estágios, sendo a
34 primeira fase a formação da película e terminando com a formação do biofilme maduro
35 (THYLSTRUP, 2001; FEJERSKOV, 2004; KIDD & FEJERSKOV, 2004). *Streptococcus*
36 *mutans* reuni vários fatores de virulência que os permitem se aderir e acumular no biofilme
37 dentário, tais como a presença de Ag I/II (Antígeno I/II), Gtf (Glicosiltransferase) e GbpB
38 (GlucanBindingProtein b). A aquisição inicial de SM pode ocorrer antes do período de janela de
39 infecção (19-31 meses), quando crianças são expostas a um elevado consumo de sacarose e ao
40 contato com a saliva de indivíduos altamente infectados (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001;
41 TANNER *et al.*, 2002; KLEIN *et al.*, 2004), sendo que as mães em lactação são as principais
42 fontes de infecção por SM em bebês (LI *et al.*, 2000).

43 A candidose se manifesta quando fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e
44 mecânicos, modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota residente,
45 ou seja, a relação de comensal depende da integridade do tecido, da microbiota e do sistema
46 imune do hospedeiro. Esta patologia pode ser localizada, determinando sintomatologia restrita a
47 essa área ou pode ser sistêmica (JOUAULT *et al.*, 2009; DE ROSSI, 2011). As infecções
48 disseminadas podem ser letais com alta taxa de morbidade e mortalidade (40 a 60%), sendo que
49 a candidose está em quarto lugar entre os principais tipos de infecções nosocomiais (WENZEL
50 & GENNINGS, 2005).

51 A candidose oral consiste em uma manifestação local que pode acometer cerca de 10 a
52 15% da população de crianças nos primeiros meses de vida (STECKSEN-BLICKS *et al.*, 2015)
53 e tem como principal agente etiológico *Candida albicans*, considerada comensal na cavidade

54 oral de seres humanos e oportunista pois pode ocasionar lesões orais quando a imunidade,
55 higiene, entre outros fatores do hospedeiro estão prejudicados (SAMARANAYAKE *et al.*,
56 2009; VAN DE VEERDONK *et al.*, 2010). Cerca de 5,7% dos recém-nascidos possuem
57 *Candida* spp na cavidade oral (RUSSELL & LAY, 1973), sendo que entre 0,5 a 1,5 anos, há um
58 aumento de 44% de crianças portadoras do fungo (KLEINEGGER *et al.*, 1996). Este micro-
59 organismo se acumula, principalmente, na língua; mas pode transitar na mucosa e saliva e se
60 organizar em biofilmes (LIM *et al.*, 2012), possibilitando sua melhor sobrevivência
61 (WILLIAMS & LEWIS, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2011) e aumento da expressão de fatores de
62 virulência (RAJENDRAN *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2012). Possui vários fatores de virulência,
63 incluindo a capacidade de se aderir às superfícies pelo crescimento filamentosos e produzir
64 enzimas hidrolíticas capazes de causar danos às células (WILLIAMS & LEWIS, 2011;
65 WILLIAMS *et al.*, 2011).

66 A colonização oral, nos primeiros dias e meses de vida do neonato, se torna progressiva
67 e desafiadora para o sistema imunológico de mucosa que está em desenvolvimento.
68 Reconhecidamente, os recém-nascidos têm uma maior incidência de colonização por vários
69 micro-organismos quando comparados com adultos ou crianças mais velhas, devido à
70 imaturidade do sistema imunológico (CLAPP, 2006). O sistema imune de mucosa representa a
71 primeira linha de defesa da resposta imune adaptativa contra desafios infecciosos. A atividade
72 antibacteriana nas secreções é mediada, em parte, pela IgA secretora (IgAs) presente na saliva e
73 outros fluidos corporais (MICHETTI *et al.*, 1991; AICHER *et al.*, 1992; TAUDORF *et al.*,
74 1994). Esta imunoglobulina possui a capacidade de controlar a microbiota oral através da
75 redução da aderência de bactérias na mucosa oral e na superfície dentária. A saliva tem um
76 papel fundamental na adesão inicial microbiana nas superfícies. Um estudo demonstrou que a
77 formação dos biofilmes de SM e CA são diminuídos na presença de saliva (AHN *et al.*, 2008).

78 Vários fatores podem influenciar o desenvolvimento eficaz de uma resposta imune de
79 mucosa, incluindo o estado nutricional, aleitamento materno, exposição a antígenos, fatores
80 genéticos e idade gestacional (YAMASHIRO *et al.*, 1989). Um estudo recente demonstrou que,
81 ao nascerem, alguns bebês possuem anticorpos IgA salivares contra os antígenos de virulência

82 de SM (BORGES *et al.*, 2015), mas são baixos, especialmente em prematuros, demonstrando
83 que a saliva pode não ser capaz de combater a colonização microbiana oral inicial.

84 O leite materno é caracterizado por um complexo nutricional e de sistema de defesa,
85 que inclui imunoglobulinas, lactoferrina, caseínas, lactoperoxidase, lisozima, leucócitos,
86 oligossacarídeos anti-aderentes, lipídios antivirais e agentes anti-inflamatórios (HANSON &
87 KOROTKOVA, 2002) que podem ajudar neste desafio inicial infeccioso. A IgA, principal
88 imunoglobulina presente no leite materno, tem a função de aglutinação dos antígenos
89 bacterianos, impedindo sua aderência às superfícies mucosas, não permitindo que atravessem a
90 barreira epitelial, protegendo o recém-nascido contra a invasão microbiana e neutralizando as
91 toxinas liberadas pelos patógenos (HURLEY & THEIL, 2011). Um estudo recente mostrou que
92 o colostro possui altos níveis de IgA contra Ag I/II, Gtf e GbpB de SM (PETRECHEN *et al.*,
93 2015) suprimindo a ausência destes anticorpos na saliva de neonatos.

94 O leite materno também possui oligossacarídeos livres, que são componentes naturais
95 do leite de todos os mamíferos placentários (BOEHM & STAHL, 2007). Os oligossacarídeos
96 são o terceiro maior componente contínuo e abundante presente no leite materno, após a lactose
97 e lipídeos (GUDIEL-URBANO & GONI, 2001; NEWBURG *et al.*, 2005). Há evidência de que
98 os oligossacarídeos humanos inibem a adesão e a ação dos patógenos na superfície epitelial,
99 tornando-os importantes componentes de proteção à saúde infantil (BOEHM & STAHL, 2007),
100 contribuindo para o desenvolvimento do sistema imune em crianças (DAI *et al.*, 2000). Os
101 oligossacarídeos compreendem dois grupos, um composto de oligossacarídeos neutros, muitos
102 dos quais são fucozilados; enquanto o outro contém oligossacarídeos acídicos; sendo, a maioria,
103 sializados (NEWBURG *et al.*, 1995; BOEHM & STAHL, 2007). Mais de 93 oligossacarídeos
104 foram encontrados no leite humano (ASAKUMA *et al.*, 2007); a maioria associados ao ácido
105 siálico, sendo, portanto, o leite materno a maior fonte deste ácido e também galactose para o
106 neonato, que é essencial para o desenvolvimento do cérebro (GUDIEL-URBANO & GONI,
107 2001). Os oligossacarídeos predominantes no leite materno são a 3' Sialolactose e 6'

108 Sialolactose; variam em concentração, de acordo com os dias de lactação (ASAKUMA *et al.*,
109 2007).

110 A função dos oligossacarídeos no controle da invasão patogênica está associada,
111 principalmente, a interferências no processo inicial de infecção, que é a adesão dos patógenos à
112 célula-alvo. Isto porque muitos patógenos reconhecem estruturas de carboidratos sobre a
113 superfície celular como um receptor (KUNZ & RUDLOFF, 1993). Alguns oligossacarídeos do
114 leite humano têm a mesma estrutura destes receptores de células-alvo e são considerados
115 inibidores potenciais da infecção; pois eles são receptores solúveis análogos para estes
116 patógenos. Vários micro-organismos patogênicos, tais como *Vibrio colera*, *Escherichia coli*,
117 *Helicobacter pylori*, e vírus influenza A e B, reconhecem receptores contendo ácido siálico das
118 células alvo e o sialil do leite humano podem funcionar como receptor análogo, inibindo a
119 fixação destes agentes patogênicos à célula alvo (KUNZ & RUDLOFF, 1993; IDOTA *et al.*,
120 1995; KUNZ *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2002). Também os oligossacarídeos do leite humano
121 podem afetar a ativação de células T e produção de citocinas em estudo *in vitro* com células T
122 derivadas do sangue do cordão umbilical humano (EIWEGGER *et al.*, 2004). Oligossacarídeos
123 acídicos estão também envolvidos em reações do sistema imunitário, tais como a interação com
124 selectinas, por exemplo, em processos de inflamação (RUDLOFF *et al.*, 2002). Todos estes
125 efeitos combinam-se para proporcionar uma proteção muito eficaz contra uma infecção
126 intestinal pós-natal e a estimulação do sistema imunológico pelo leite humano (BOEHM &
127 STAHL, 2007).

128 Desta maneira, a infecção oral no início da vida do neonato requer tratamentos
129 restauradores e invasivos. O leite materno é uma importante fonte de defesa contra a adesão
130 microbiana, mas pouco se sabe sobre a sua interferência e da 3' Sialolactose na formação e
131 desenvolvimento de biofilmes de SM e CA *in vitro* em condições normais de gestação e
132 desenvolvimento de gestações sem intercorrências.

133

134

135

136 2. HIPÓTESE

137 A presença do leite materno reduz a formação de biofilme tanto de CA como SM
138 devido à interferência na adesão inicial dos micro-organismos ao poliestireno, sendo que 3'
139 Sialolactose pode ser participante neste processo pois pode inibir esta adesão microbiana.

140 3. OBJETIVOS

141 3.1 Geral

142 O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a formação e o desenvolvimento do
143 biofilme de *Streptococcus mutans* (SM) e *Candida albicans* (CA) em presença de colostro
144 humano (C) com ou sem saliva (S) e também observar a interferência de 3' Sialolactose (SI)
145 neste processo.

146

147 3.2 Específicos

148 Os objetivos específicos incluíram:

- 149 - Avaliar a adesão inicial microbiana após a aplicação de colostro;
- 150 - Avaliar a biomassa do biofilme formado após 24 e 48 horas em presença do colostro;
- 151 - Verificar a interferência de 3' Sialolactose antes, durante e após a formação do biofilme;
- 152 - Quantificar a biomassa formada em presença de saliva;
- 153 - Associar a biomassa de biofilme formada com saliva em conjunto com o colostro;
- 154 - Comparar os valores de biomassa e porcentagem de redução do biofilme entre o colostro,
155 saliva e 3' Sialolactose.

156

157 4. MATERIAIS E MÉTODOS

158 4.1 Delineamento Experimental

159 As amostras foram obtidas de puérperas e neonatos na Maternidade do Hospital das
160 Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (MATER) após aprovação do Comitê de

161 Ética do HC/FMRP (Anexo A) e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
 162 (TCLE) para participação das mães e recém-nascidos. Um total de 30 amostras de colostro e
 163 saliva do neonato foram selecionadas para serem analisadas *in vitro* no presente estudo. As
 164 amostras foram selecionadas a partir de gestantes de boa saúde geral e de gestações a termo.
 165 Foram excluídas amostras provenientes de gestações pré-termo, com intercorrências durante a
 166 gestação e após o parto; mães e neonatos que apresentaram uso de antibióticos ou corticoides.
 167 Foi aplicado um questionário (Anexo B) em que se avaliaram dados da mãe e do recém-nascido:
 168 socioeconômicos; saúde geral e saúde oral.

169 **4.2. Coleta e armazenamento amostral**

170 A coleta foi realizada por enfermeiras e técnicos de laboratório da FMRP logo após o
 171 parto, por expressão manual, e depositadas em tubos estéreis do tipo Falcon e imersas em gelo.
 172 As amostras de saliva foram coletadas através da sucção com pipetas de Pasteur estéreis em 10
 173 mM de EDTA e mantidas em gelo.

174 As amostras foram então encaminhadas para o Laboratório de Biologia Celular e
 175 Molecular da UNIUBE onde foram centrifugadas a 4° C por 5 minutos. O sobrenadante obtido
 176 na centrifugação da saliva foi transferido para um novo tubo eppendorf enquanto que a camada
 177 lipídica do leite materno foi descartada. As amostras foram então armazenadas a -70°C até a sua
 178 utilização e realização dos ensaios de formação do biofilme.

179 **4.3. Seleção das cepas microbianas e meios de cultura**

180 O quadro abaixo indica a cepa, seu registro de ATCC, e os meios de cultura empregados
 181 para obtenção do inóculo para os testes que serão descritos a seguir:

182

Micro-organismos	ATCC (American Collection)	Type	Culture	Meio de cultura (Difco)
<i>Candida albicans</i>	10231			BHI (Brian Heart Infusion)
<i>Streptococcus mutans</i>	25175			TSB (Tryptic Soy Broth)

183

184 **4.4. Condições de crescimento e Cultivo microbiano**

185 Tubos contendo 10 mL de meio de cultura líquido, diluído, segundo as instruções do
 186 fabricante, foram autoclavados. Nestes tubos foram inoculados os micro-organismos e
 187 incubados por 24h a 37°C. Após o período de incubação, foi realizada a leitura da Densidade
 188 Óptica (DO) a 600nm em Espectrofotômetro Digital (ThermoScientific) para obtenção de
 189 DO=1. Inoculou-se 2,5 mL desta cultura em um balão volumétrico contendo 25 mL de meio de
 190 cultura, formando-se uma cultura fresca microbiana para a realização do biofilme. Em seguida
 191 foram utilizadas 30 amostras de colostro e 30 amostras de saliva, em duplicada, e foram
 192 aplicadas nas placas de 96 poços, de acordo com diferentes de acordo com os grupos de estudo e
 193 tempo de aplicação das amostras abaixo:

194 **4.5. Grupos de Estudo e tempo de aplicação das amostras**

195 *Grupos de aplicação do colostro*

Grupos	Descrição	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
C-A	Aplicação de 3 µL de colostro humano 2 horas ANTES da inserção de 150 µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme.	SM-C-A	CA-C-A
C-DU	Aplicação de 3 µL de colostro DURANTE a inserção 150µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme.	SM-C-DU	CA-C-DU
C-DE	Aplicação de 3 µL colostro DEPOIS de 24 horas da inserção de 150µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo.	SM-C-DE	CA-C-DE

196 *Grupo de aplicação da saliva do neonato*

S-A	Aplicação de 3 µL de saliva 2 horas ANTES da inserção de 150 µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme.	SM-S-A	CA-S-A
------------	---	--------	--------

197 *Grupo de aplicação da saliva do neonato e colostro*

C+S-A	Aplicação de 3 µL de colostro e 3 µL saliva 2 horas ANTES da inserção de 150µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme.	SM-C+S-A	CA-C+S-A
--------------	--	----------	----------

198 *Grupos de aplicação da 3' Sialolactose*

SI-A	Aplicação de 3' Sialolactose a 10 mg/mL ou a 20 mg/mL, 2 horas ANTES da inserção de 150µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme.	SM-SI-A-10 SM-SI-A-20	CA-SI-A-10 CA-SI-A-20
SI-DU	Aplicação de 3' Sialolactose a 10 mg/mL ou a	SM-SI-DU-10	CA-SI-DU-10

	20 mg/mL DURANTE a inserção 150µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme.	SM-SI-DU-20	CA-SI-DU-20
SI-DE	Aplicação de 3' Sialolactose a 10 mg/mL ou a 20 mg/mL DEPOIS de 24 horas da inserção de 150µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo.	SM-SI-DE-10 SM-SI-DE-20	CA-SI-DE-10 CA-SI-DE-20
<i>Grupos sem aplicação de amostras</i>			
B24h	Aplicação de 150 µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme por 24 horas.	SM-B24h	CA-B24h
B48h	Aplicação de 150 µL do meio de cultura inoculado com micro-organismo para o desenvolvimento do biofilme por 48 horas.	SM-B48h	CA-B48h

199

200

201

4.6. Formação do biofilme microbiano

202

203

204

205

206

4.6.1. Fixação e coloração do Biofilme microbiano

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

Foram utilizadas placas de 96 poços (Costar) que receberam 150µL em cada poço das culturas microbianas frescas descritas no item 4.4. As placas foram então incubadas por 24 ou 48 horas a 37°C em aerobiose para CA e anaerobiose para SM para formação da biomassa microbiana.

As células planctônicas não aderidas nos biofilmes formados foram removidas através da retirada dos meios de cultura nos poços das placas de microtitulação. Os meios de cultura foram fixados com 100µL de solução de formaldeído a 10% e deixados por 24 horas à temperatura ambiente. O formaldeído foi removido e 100µL de solução de 0,1% de cristal violeta foi adicionado e as placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 hora. A solução de cristal violeta foi removida e as placas foram, então, lavadas por 2 vezes com água destilada. Após a lavagem e remoção da água, os poços receberam 250 µL de álcool absoluto 99% solubilizando o cristal aderido.

A determinação do crescimento microbiano e a formação do biofilme foram avaliadas através da leitura das absorbâncias de cada poço das placas de microtitulação a 490 nm em Leitor de Elisa automático (Thermoplate).

218 **4.7 Análises dos Resultados e Estatísticas**

219 Os resultados foram avaliados pela mensuração da DO encontrada após coloração com
220 cristal violeta. A média das DO's encontradas nas duplicatas foram calculadas e comparadas
221 entre os grupos. As comparações da quantidade de biomassa formada, em presença das
222 amostras, foram comparadas e analisadas por ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As
223 frequências de amostras que aumentaram ou diminuíram os biofilmes foram comparadas entre
224 os grupos e foi empregado o teste do Qui-Quadrado e teste Exato de Fisher para repetições
225 inferiores a 5. Utilizou-se o teste de Correlação de Pearson para comparar os grupos do estudo.
226 Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

227

228 **5. RESULTADOS**

229 **5.1. Influência das amostras testadas na formação de biofilme de SM.**

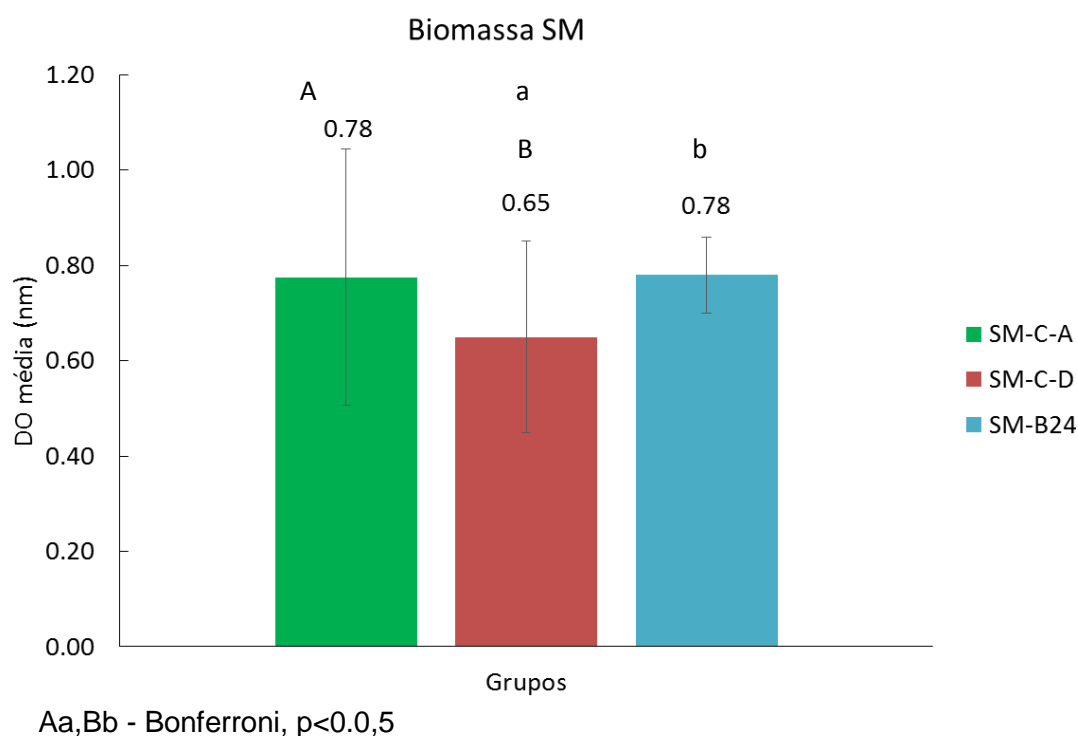
230 O Biofilme formado em 24 horas teve uma DO média de $0,78 \pm 0,12$ que foi menor e
231 estatisticamente diferente do biofilme de 48 horas ($0,98 \pm 0,22$) (ANOVA, $p < 0,05$). A média da
232 DO mensurada nos poços permitiram observar a formação e desenvolvimento da biomassa
233 formada nos grupos que receberam as amostras de colostro antes, durante e depois da formação
234 do biofilme, e comparar com os biofilmes de 24 e 48 horas.

235 Não houve diferença estatisticamente significativa na DO média da biomassa do
236 biofilme formado nos grupos que receberam as amostras de colostro aplicadas antes (SM-C-A)
237 quando comparado a DO dos biofilmes formados durante 24 horas (SM-B24h), já que a DO de
238 SM-C-A foi, em média, de $0,78 \pm 0,26$, idêntica a média do SM-B24h (Figura 1). Por outro lado,
239 a incubação conjunta do colostro com o inóculo bacteriano diminui o desenvolvimento e
240 acúmulo do biofilme após 24 horas, isto porque a DO média de SM-C-DU foi de $0,65 \pm 0,20$,
241 estatisticamente menor que a DO do controle, SM-B24h (Figura 1, Anova, $p < 0,05$). A

242 comparação entre as Dos dos biofilmes dos grupos que receberam o colostro, SM-C-A vos SM-
 243 C-DU, apresentou diferença estatisticamente significativa (Anova, $p < 0,05$).

244

245 Figura 1. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de *Streptococcus mutans* (SM) de acordo com
 246 os grupos em que o colostro foi aplicado antes (SM-C-A), durante a inoculação microbiana (SM-C-DU) e
 247 comparado com biofilme de SM de 24 horas (SM-B24h).



248

249 A análise da presença do colostro, quando aplicado após 24 horas da inoculação inicial
 250 microbiana com a formação do biofilme estabelecida (SM-C-DE), mostrou que, após 24 horas
 251 de incubação com o colostro, a biomassa formada (Figura 2) é menor quando comparada com
 252 biofilmes formados durante 48 horas sem a presença de colostro (SM-B48h) (Anova, $p < 0,05$).

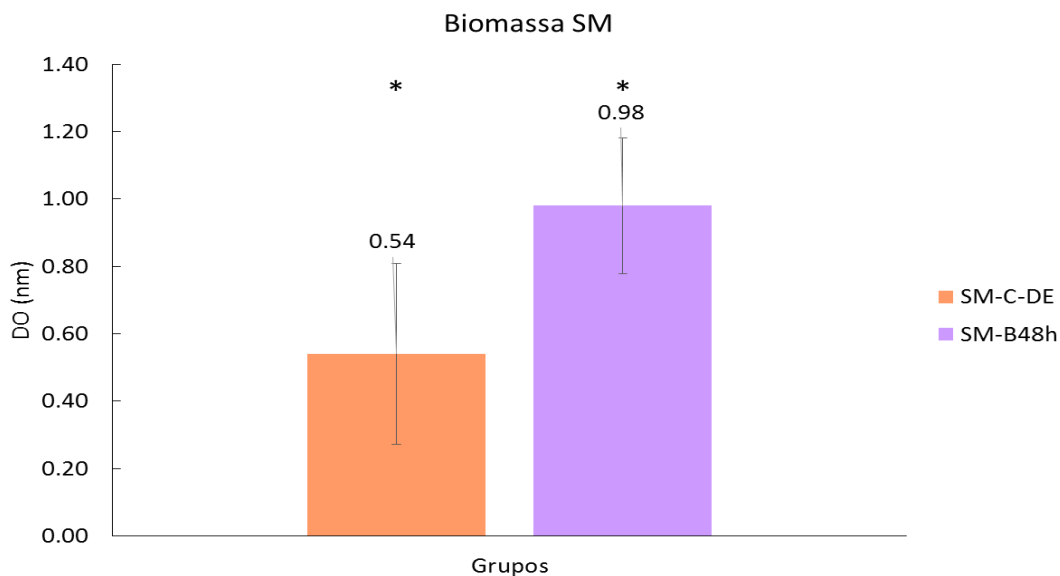
253

254

255

256 Figura 2. Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que
 257 o colostro foi aplicado após 24 horas da inoculação microbiana (SM-C-DE) e comparado com biofilme de
 258 SM de 48 horas (SM-B48h).

259



* ANOVA, $p < 0.05$

260

261

262 A DO média do grupo de amostras que receberam saliva em conjunto com o colostro
 263 (SM-C+S-A) previamente foi maior significativamente do que a do grupo SM-B24h (Figura 3,
 264 Anova, $p < 0,05$). A presença da saliva somente (SM-S-A) também aumentou ainda mais a
 265 formação do biofilme em relação ao SM-B24h (Anova, $p < 0,05$) embora não tenha tido
 266 diferença estatisticamente significativa de SM-C+S-A (Anova, $p > 0,05$).

267

268

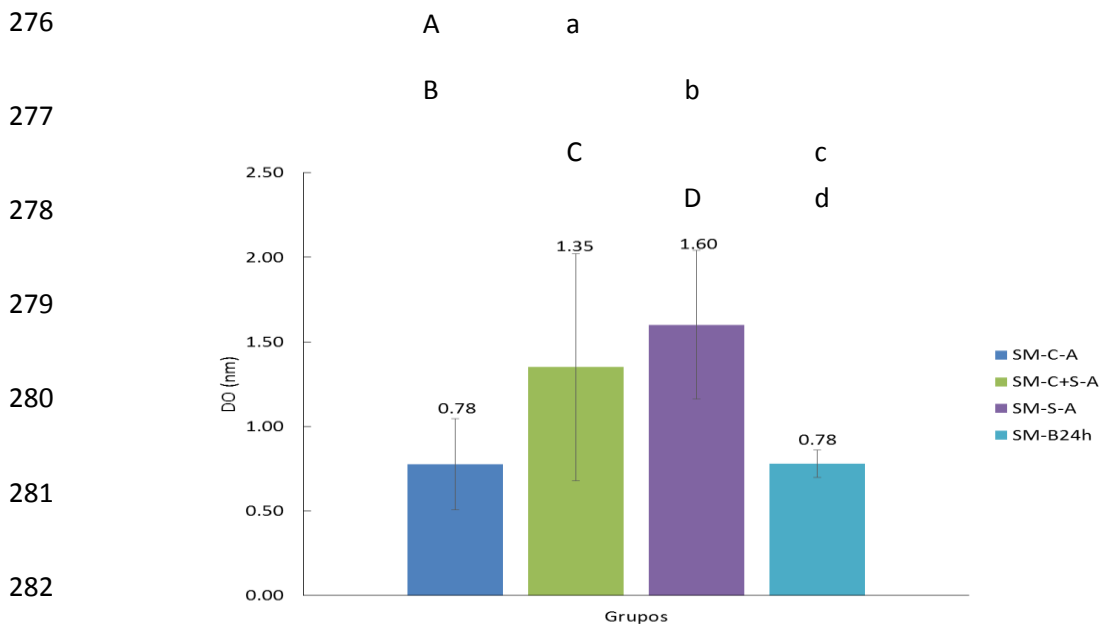
269

270

271

272

273 Figura 3. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que o
 274 colostro (SM-C-A), a saliva (SM-S-A) e colostro e saliva ao mesmo tempo (SM-C+S-A) foram aplicados
 275 antes da inoculação microbiana e o biofilme de SM de 24 horas (SM-B24h).



284 Aa, Bb, Cc, Dd - Bonferroni, $p < 0,05$

285

286 As frequências de amostras que apresentaram aumento ou diminuição da formação do biofilme
 287 de SM estão expressas na Tabela 1. A maioria das amostras testadas que receberam o colostro
 288 reduziram a formação do biofilme de SM (Tabela 1), especialmente no SM-C-DE ($^{1,2}p < 0,05$)
 289 sendo estatisticamente diferente dos SM-C-A e SM-C-DU. A porcentagem de amostras que
 290 aumentou o biofilme do grupo SM-C-A e SM-C-DU foi menor e estatisticamente diferente do
 291 que nos grupos que receberam saliva, SM-C+S-A e SM-S-A ($^{3,4,5,6}p < 0,05$). Houve diferenças na
 292 porcentagem de amostras que reduziram o biofilme entre SM-C+S-A e SM-S-A ($^7p < 0,05$).

293

294

295

296 Tabela 1. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em que o
 297 colostro (SM-C-A), (SM-C-DU), (SM-C-DE), colostro e saliva ao mesmo tempo (SM-C+S-A) e saliva
 298 (SM-S-A) foram aplicados antes da inoculação microbiana e os biofilmes de SM de 24 horas (SM-B24h)
 299 e 48 horas (SM-B48h).

Grupos (n=30)	Biomassa do biofilme de SM em relação aos controles		Porcentagem média \pm DP de:	
	Aumentada n (%)	Reduzida n (%)	aumento da biomassa	redução da biomassa
SM-C-A	10 (33) ^{1,3,5}	20 (67) ^{1,3,5}	39.2 \pm 29.1	20.5 \pm 12.8
SM-C-DU	8 (27) ^{2,4,6}	22 (73) ^{2,4,6}	15.6 \pm 14.6	28.6 \pm 17.3
SM-C-DE	0 (0) ^{1,2}	30 (100) ^{1,2}	-	45.3 \pm 15.4
SM-C+S-A	22 (73) ^{3,4,7}	8 (27) ^{3,4,7}	108.6 \pm 74.2	23.6 \pm 13.5
SM-S-A	28 (93) ^{5,6,7}	2 (7) ^{5,6,7}	114.4 \pm 47.2	17.5 \pm 5.8

¹ Teste de Fisher, $p < 0.05$; ² Teste de Fisher, $p < 0.05$; ³ Qui-quadrado, $p < 0.05$, $q = 9.60$; ⁴ Qui-quadrado, $p < 0.05$, $q = 13.06$; ⁵ Teste de Fisher, $p < 0.05$; ⁶ Teste de Fisher, $p < 0.05$; ⁷ Teste de Fisher, $p < 0.05$.

300

301

302

5.2. Influência das amostras testadas na formação de biofilme de CA.

303

304

305

306

307

308

309

310

311

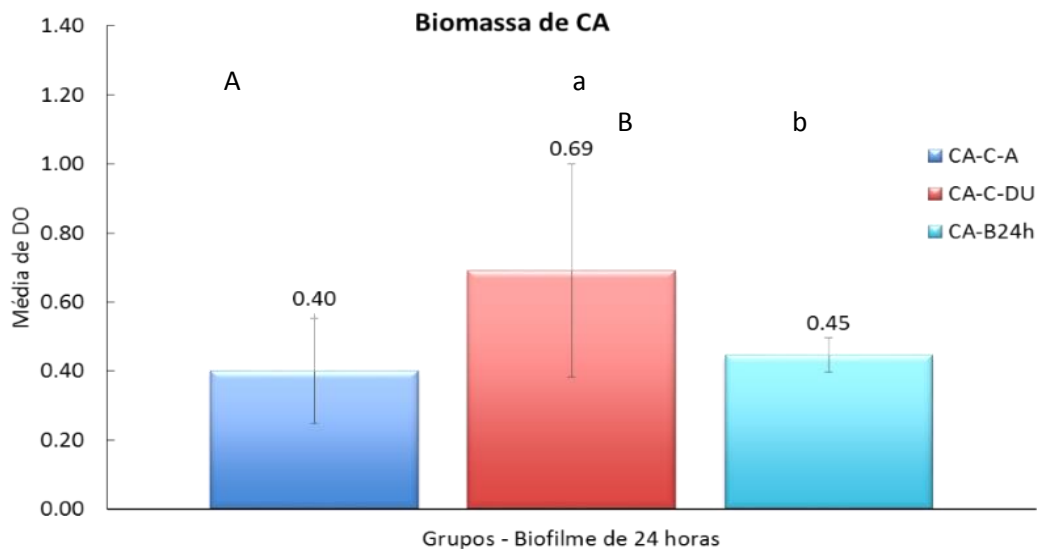
312

313

O Biofilme formado em 24 horas teve uma DO média de $0,45 \pm 0,05$ que foi menor e estatisticamente diferente do biofilme de 48 horas ($0,90 \pm 0,10$) (ANOVA, $p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa na DO média da biomassa do biofilme formado nos grupos que receberam as amostras de colostro aplicadas antes (CA-C-A) quando comparado a DO dos biofilmes formados durante 24 horas (CA-B24h) (Figura 4, $p > 0,05$). Por outro lado, a incubação conjunta do colostro com o inóculo fúngico aumentou significativamente o desenvolvimento e acúmulo do biofilme após 24 horas, isto porque a DO média de CA-C-DU foi de $0,69 \pm 0,20$, estatisticamente maior que a DO do controle, CA-B24h (Figura 4, Anova, $p < 0,05$). A comparação entre as DO's dos biofilmes dos grupos que receberam o colostro, CA-C-A vs CA-C-DU, apresentou diferença estatisticamente significativa (Anova, $p < 0,05$).

314 Figura 4. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de *Candida albicans* de acordo com
 315 os grupos em que o colostro foi aplicado antes (CA-C-A), durante a inoculação microbiana
 316 (CA-C-DU) e comparado com biofilme de CA de 24 horas (CA-B24h).

317



Aa, Bb – Bonferroni, $p < 0.05$

318

319

320 A análise da presença do colostro, quando aplicado após 24 horas da inoculação inicial
 321 microbiana com a formação do biofilme estabelecida (CA-C-DE), mostrou que, após 24 horas
 322 de incubação com o colostro, a biomassa formada (Figura 5) é parecida quando comparada com
 323 biofilmes formados durante 48 horas sem a presença de colostro (CA-B48h).

324

325

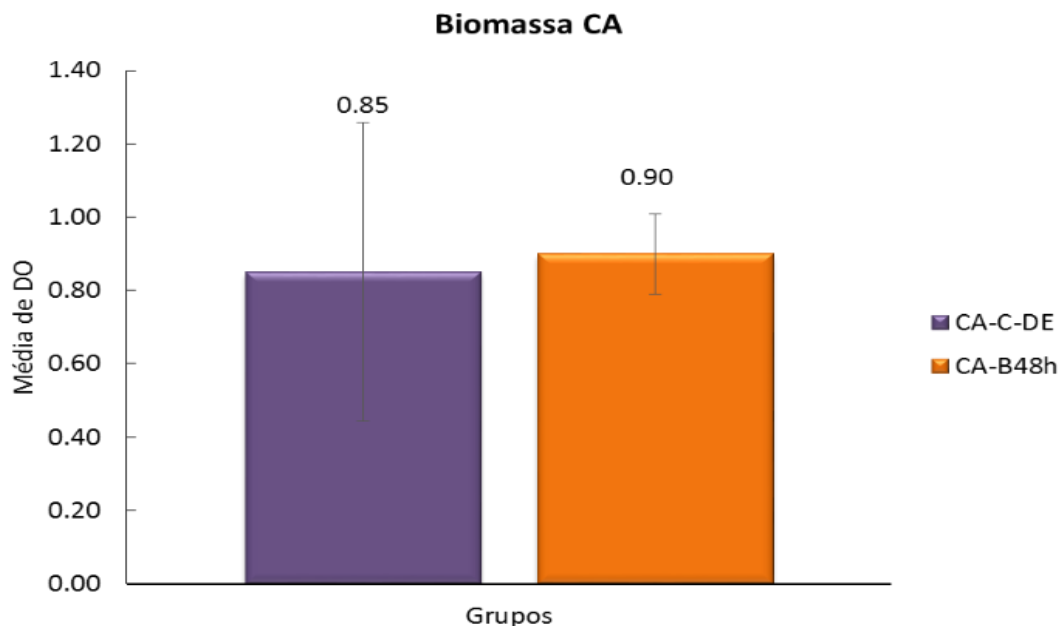
326

327

328

329

330 Figura 5. Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de CA de acordo com os
331 grupos em que o colostro foi aplicado após 48 horas da inoculação microbiana (CA-C-DE) e
332 comparado com biofilme de CA de 48 horas (CA-B48h).



333

334

Anova, $p > 0,05$

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

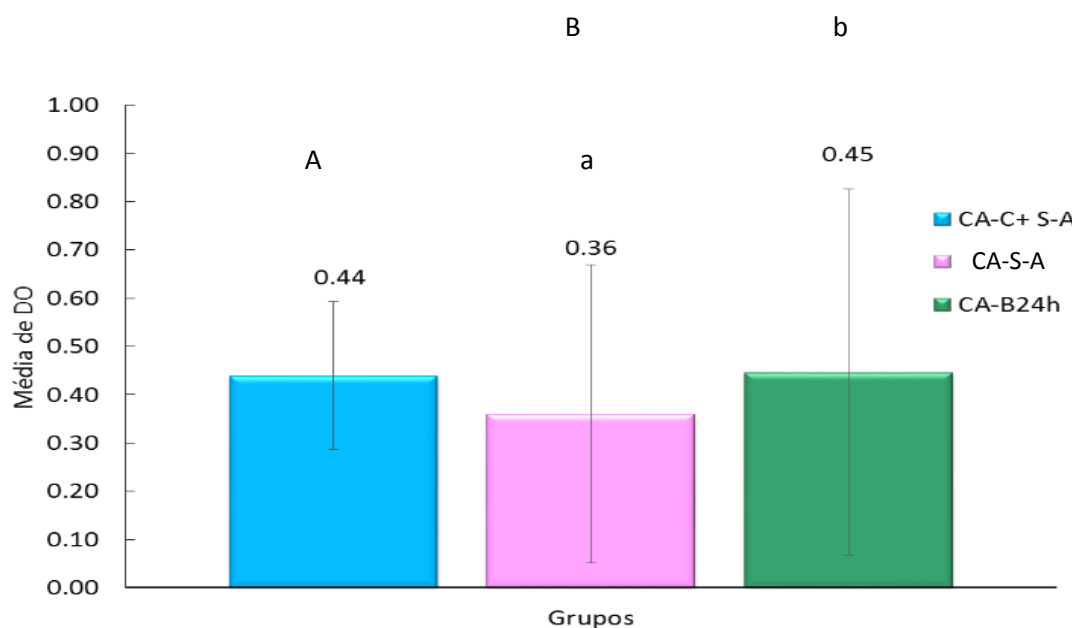
347

348

A DO média do grupo de amostras que recebeu saliva previamente (CA-S-A) foi menor significativamente do que a do grupo CA-B24h (Figura 6, Anova, $p < 0,05$). A presença da saliva em conjunto com colostro (CA-C+S-A) não reduziu a formação do biofilme em relação ao CA-B24h (Anova, $p > 0,05$). Houve diferença estatisticamente significativa entre as DO's de CA-S-A vs CA-C+S-A (Figura 6, $p < 0,05$). As comparações entre a aplicação do colostro e da saliva mostraram que não houve diferenças significantes entre a aplicação do colostro ou saliva antes do inóculo fúngico (CA-C-A vs CA-S-A, $p > 0,05$). Por outro lado, a aplicação de colostro antes, sem a saliva, reduziu mais a DO quando comparado com a aplicação conjunta de saliva e colostro (Anova, $p < 0,05$).

349 Figura 6. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em
 350 que a saliva (CA-S-A) e colostro e saliva ao mesmo tempo (CA-C+S-A) foram aplicados antes
 351 da inoculação microbiana e o biofilme de CA de 24 horas (CA-B24h).

352



Aa, Bb – Bonferroni, $p < 0,05$

353 As frequências de amostras que apresentaram aumento ou diminuição da formação do
 354 biofilme de CA estão expressas na Tabela 2. A maioria das amostras de colostro, quando
 355 aplicadas antes ou depois da formação do biofilme, ou quando acompanhadas de saliva,
 356 reduziram a formação do biofilme (Tabela 2). A aplicação conjunta de colostro durante a
 357 inoculação microbiana (CA-C-DU) fez com que a maioria dos biofilmes fossem aumentados, ou
 358 seja, 87% dos ensaios tiveram uma DO maior do que o controle (CA-B24h). Também a
 359 frequência de amostras com biofilme aumentado neste grupo (CA-C-DU) foi maior e
 360 estatisticamente diferente dos demais grupos (^{1,2,3,4} $p < 0,05$). Não houve diferenças na frequência
 361 de amostras que reduziram o biofilme entre os grupos CA-C-A, CA-C-DE e CA-C+S-A (Tabela
 362 2, $p > 0,05$). Por outro lado o grupo CA-S-A teve a maior frequência de amostras (93%) que
 363 reduziram o biofilme e foram estatisticamente diferentes dos demais grupos (Tabela 2, $p < 0,05$).

364

365 Tabela 2. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em
 366 que o colostro (CA-C-A), (CA-C-DU), (CA-C-DE), a saliva (CA-S-A) e colostro e saliva ao
 367 mesmo tempo (CA-C+S-A) foram aplicados antes da inoculação microbiana e o biofilme de CA
 368 de 24 horas (CA-B24h).

Grupos (n=30)	Biomassa do biofilme de CA em relação aos controles		Porcentagem média \pm DP de:	
	Aumentada n (%)	Reduzida n (%)	aumento da biomassa	redução da biomassa
CA-C-A	10 (33) ^{1,5}	20 (67) ^{1,5}	29.8 \pm 23.6	30.7 \pm 15.2
CA-C-DU	26 (87) ^{1,2,3,4}	4 (13) ^{1,2,3,4}	64.1 \pm 69.2	8.4 \pm 6.3
CA-C-DE	11 (37) ^{2,6}	19 (63) ^{2,6}	38.4 \pm 47.8	29.4 \pm 17.9
CA-C+S-A	11 (37) ^{3,7}	19 (63) ^{3,7}	52.6 \pm 30.5	56.3 \pm 32.0
CA-S-A	2 (7) ^{4,5,6,7}	28 (93) ^{4,5,6,7}	40.0 \pm 22.0	23.6 \pm 12.6

^{1,2,3,4,5,6,7} Teste de Fisher, $p < 0.05$

369

370

371

5.3. Influência da 3' Sialolactose na formação de biofilme de CA e SM

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

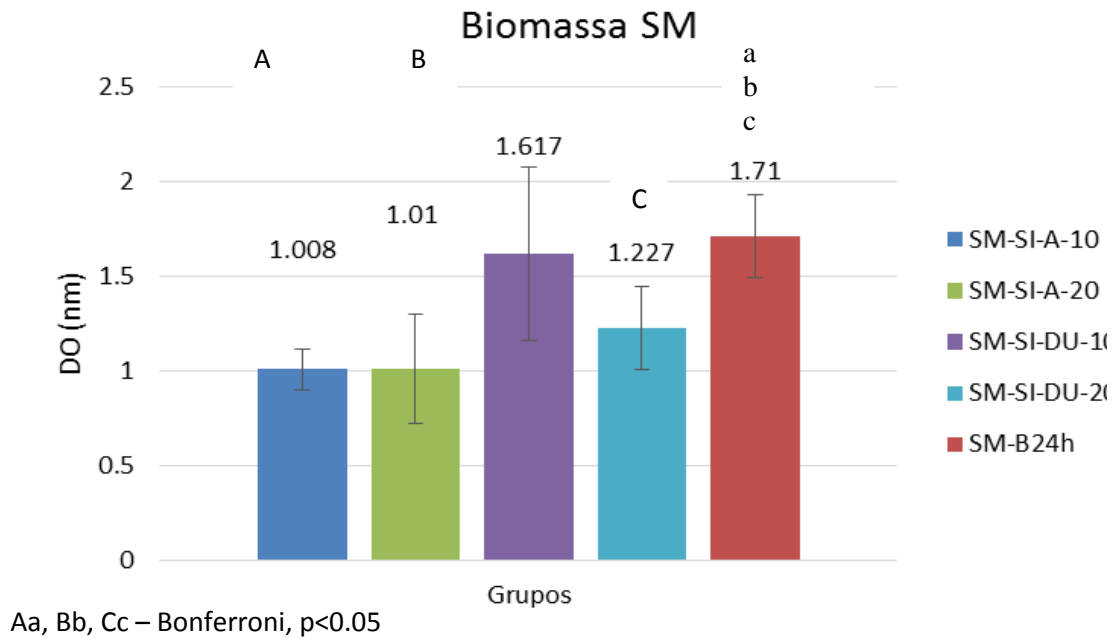
384

385

Houve diferenças estatisticamente significantes das DO's observadas nos biofilmes de 24 horas de SM na presença da 3' Sialolactose (SI) aplicada antes do inóculo em relação ao controle (Figura 7, Anova, $p < 0,05$) independente da concentração testada, mas não foram encontradas diferenças quando SI foi aplicado em conjunto com o inóculo (Figura 7, Anova, $p > 0,05$) e também quando aplicado após formação do biofilme (Figura 8, Anova, $p > 0,05$).

386 Figura 7. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de SM de acordo com os grupos em
 387 que a 3' Sialolactose foi aplicada antes (SM-SI-A-10 e SM-SI-A-20), durante a inoculação
 388 microbiana (SM-SI-DU-10 e SM-SI-DU-20) e comparado com biofilme de SM de 24 horas
 389 (SM-B24h).

390



391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

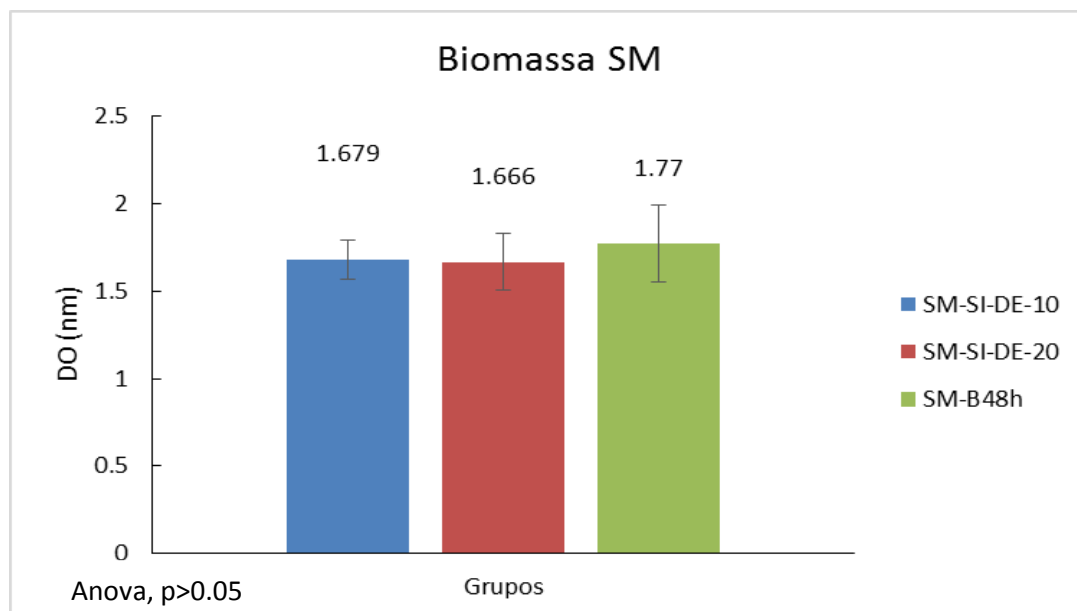
401

402

403

404

405 Figura 8. Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de SM de acordo com os
406 grupos em que a 3' Sialolactose foi aplicada após 48 horas da inoculação microbiana (SM-SI-
407 DE-10 e SM-SI-DE-20) e comparado com biofilme de SM de 48 horas (SM-B48h).



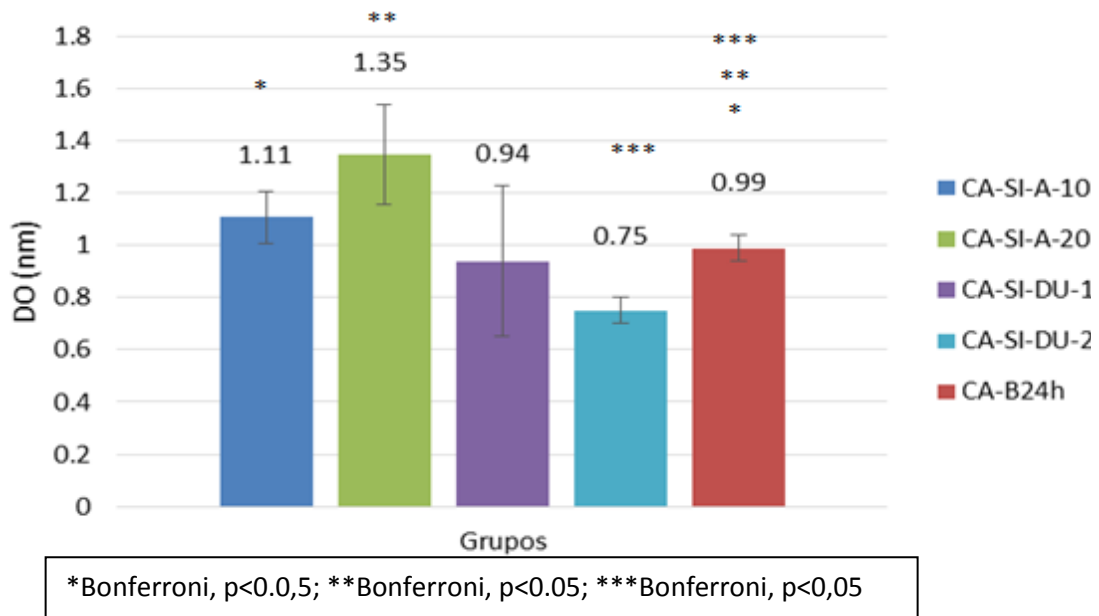
408

409

410 Houve diferenças estatisticamente significantes das DO's observadas nos biofilmes de
411 24 horas de CA na presença da 3' Sialolactose (CA-SI-DU-20) aplicada durante em relação ao
412 controle (Figura 9, Anova, $p < 0,05$), mas não foram encontradas diferenças quando SI foi
413 aplicado depois da formação do biofilme (CA-SI-DE-10 e CA-SI-DE-20) (Figura 9 e 10,
414 Anova, $p > 0,05$).

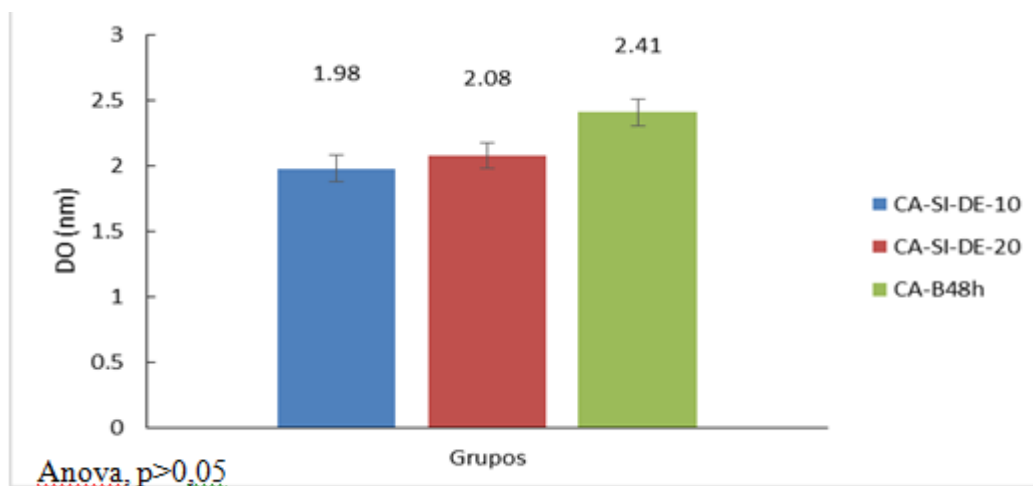
415

416 Figura 9. Densidade Óptica (DO) da biomassa de biofilme de CA de acordo com os grupos em
 417 que a 3´Sialolactose foi aplicada antes (CA-SI-A-10 e CA-SI-A-20), durante a inoculação
 418 microbiana (CA-SI-DU-10 e CA-SI-DU-20) e comparado com biofilme de CA de 24 horas
 419 (CA-B24h).



420

421 Figura 10. Densidade Óptica (DO) média da biomassa de biofilme de CA de acordo com os
 422 grupos em que a 3´ Sialolactose foi aplicada após 48 horas da inoculação microbiana (CA-SI-
 423 DE-10 e CA-SI-DE-20) e comparado com biofilme de CA de 48 horas (CA-B48h)



424

425

426 6. DISCUSSÃO

427 O presente trabalho avaliou o desenvolvimento do biofilme de SM e CA em placas de
428 poliestireno em presença de colostro em momentos distintos: antes da inoculação microbiana
429 (SM-C-A ou CA-C-A), aplicação concomitante da cultura e colostro (SM-C-DU ou CA-C-DU),
430 formação de biofilme e posterior aplicação do colostro (SM-C-DE ou CA-C-DE). Também
431 foram analisadas as formações dos biofilmes na presença de saliva (SM-S-A ou CA-S-A) e a
432 saliva em conjunto com o colostro (SM-C+S-A ou CA-C+S-A) antes da inoculação microbiana.
433 A hipótese alternativa do presente estudo nos mostra que a presença do leite materno reduz a
434 formação de biofilme de SM, mas no grupo SM-C-DU pode significar interferência na adesão
435 inicial dos micro-organismos ao poliestireno. Também o colostro não interferiu na adesão e
436 acúmulo de biofilme de CA.

437 O papel dos componentes do leite materno maduro na formação e acúmulo do biofilme
438 de SM é pouco explorado. Os poucos relatos *in vitro* são controversos, já que um estudo mostra
439 que o leite materno não interfere na adesão do SM (WERNERSSON *et al.*, 2006), enquanto
440 outro afirma que a sua presença aumenta a massa do biofilme (ALLISON *et al.*, 2015). Dentre
441 os componentes presentes no leite materno a lactoferrina, caseína e IgA podem inibir a adesão
442 de SM (DANIELSSON NIEMI *et al.*, 2009).

443 Os resultados mostraram que a aplicação de colostro, antes da inoculação de SM, não
444 interferiu no desenvolvimento do biofilme, visto a média de DO do grupo SM-C-A foi idêntica
445 a DO do controle de 24 horas. No entanto, a maioria das amostras testadas, cerca de 67%,
446 reduziram em mais de 20% o biofilme formado. Estudo prévio revelou que o colostro não
447 possui componentes que ajudam na adesão de SM na hidroxiapatita (WERNERSSON *et al.*,
448 2006) pelo contrário, a presença de diversos componentes do colostro, como por exemplo,
449 caseína, lactoferrina, IgA, IgG entre outros, podem diminuir a adesão de SM *in vitro*
450 (DANIELSSON NIEMI *et al.*, 2009).

451 A inibição da formação de biofilme de SM em presença de colostro ficou mais evidente
452 nos grupos em que o colostro foi aplicado concomitante com o inóculo e também após o
453 biofilme já formado; evidenciando suas propriedades como regulador do acúmulo microbiano.
454 Além das DOs médias dos grupos que receberam colostro terem sido menores que os controles
455 (SM-B24h e SM-B48h), as frequências de amostras que diminuíram o biofilme também foram
456 superiores, ou seja, acima de 73% das amostras de colostro testadas reduziram o biofilme em
457 mais de 28% (Tabela 1). Estes resultados foram diferentes dos encontrados por (ALLISON *et*
458 *al.*, 2015), que demonstraram um aumento do biofilme em presença de leite materno. Uma das
459 razões pode estar associada ao tipo de leite materno que, no presente estudo, foi o colostro; e,
460 neste outro, foi o leite maduro, que contém diferença de composição, principalmente
461 relacionadas com as concentrações de IgA que são inferiores (OVONO ABESSOLO *et al.*,
462 2011). Estudo prévio revelou que estas amostras testadas aqui contêm uma alta concentração de
463 IgA contra antígenos de virulência de SM, tais como Ag I/II, Gtf e GbpB (PETRECHEN *et al.*,
464 2015) que estão envolvidos na sua capacidade de se aderir e acumular em biofilmes. As
465 imunoglobulinas A têm uma função de aglutinação, impedindo a aderência microbiana às
466 superfícies mucosas, não permitindo que atravessem a barreira epitelial, protegendo o recém-
467 nascido contra a invasão microbiana e, também, a função de neutralizar as toxinas liberadas
468 pelos patógenos (HANSON, 1998; HURLEY & THEIL, 2011).

469 Se, por um lado, são claras as evidências dos efeitos benéficos do leite materno para
470 inúmeras infecções, para a cárie são controversas. Para alguns, evidências científicas coesas que
471 comprovam que o leite materno possa estar associado com o surgimento de cárie são escassas
472 (SALONE *et al.*, 2013) e, para outros estudos recentes, a cárie dentária foi o único desfecho
473 negativo associado à amamentação (SANTOS *et al.*, 2016; VICTORA *et al.*, 2016). Verificou-
474 se a associação entre a amamentação por períodos mais longos que 12 meses e um aumento de 2
475 a 3 vezes na ocorrência de cárie dentária em dentes decíduos (VICTORA *et al.*, 2016),
476 associados à falta de higiene após as mamadas (THAM *et al.*, 2015). Os resultados do presente
477 estudo indicam a amamentação para o controle da proliferação de SM, especialmente nas

478 crianças edêntulas já que na maioria dos grupos em que o colostro foi aplicado a DO foi maior
479 que a do controle. Os benefícios dos efeitos diretos da amamentação na aquisição de SM seriam
480 importantes para uma população como a brasileira, que possui uma colonização por SM
481 precoce, até mesmo antes da erupção da dentição decídua (ALVES *et al.*, 2009).

482 A presença de saliva do neonato, aplicada antes do biofilme, aumentou a formação
483 deste; e, a presença do colostro em conjunto com a saliva (grupo SM-C+S-A), diminuiu a
484 frequência de amostras que aumentaram a proliferação do biofilme. Se por um lado a saliva
485 permite uma maior adesão, por outro, o colostro parece interferir no acúmulo de SM. A adesão
486 inicial do SM em amostras salivares formando a película adquirida sobre o esmalte contribui
487 para a formação do biofilme dentário (GIBBONS, 1989). *S. mutans* interage com proteínas
488 salivares, tais como a glicoproteína-340 (GP340) (BIKKER *et al.*, 2002), por meio do antígeno
489 proteico da superfície celular denominado *pac*, também denominado de Ag I/ II (RUSSELL *et*
490 *al.*, 1980).

491 A formação de aglomerados de *Candida albicans* em biofilmes representa um dos
492 principais mecanismos de virulência desta levedura por torná-los menos susceptíveis à ação
493 antimicrobiana (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999). A adesão do fungo às células do hospedeiro é
494 mediada pelas adesinas e a expressão destas moléculas sofre influência de fatores ligados tanto
495 ao ambiente quanto ao hospedeiro. A ação das adesinas é essencial para que o fungo sobreviva
496 superficialmente aderido às células epiteliais ou internalizado por elas (PEREIRA, 2009; DE
497 ROSSI, 2011). Os resultados do presente estudo mostraram que a presença de colostro aplicado
498 antes ou depois do inóculo fúngico não alteram a média de DO quando comparado aos controles
499 de crescimento. No entanto, as análises de frequência de amostras de colostro analisadas
500 mostraram que mais de 63% diminuíram o biofilme. Vários componentes do colostro possuem
501 atividade anti-CA, como IgA (GOLDMAN, 1993) e também lactoferrina que interferem na
502 proliferação de CA em modelos animais (VELUSAMY *et al.*, 2014).

503 Embora os resultados mostraram que 93% das amostras salivares testadas reduziram o
504 biofilme de CA, a literatura mostra algumas controvérsias a respeito da interferência da saliva
505 na formação do biofilme de CA. Em situações de diminuição do fluxo salivar (xerostomia ou
506 disfunção na produção de saliva) há uma diminuição IgA o que favorece índices elevados de
507 colonização por *Candida* spp e também SM (OLIVEIRA, 2009.; VASCONCELOS, 2010).
508 Alguns estudos apontam que vários componentes salivares podem reduzir a população fúngica
509 (TOBGI *et al.*, 1988; NIKAWA *et al.*, 1993; ELGUEZABAL *et al.*, 2008); pois, na saliva,
510 existem moléculas responsáveis por impedir a adesão dos fungos à prótese, como lisozima,
511 lactoferrina, histatinas, peroxidases, calprotectina e IgA salivar, mas existem outras que
512 favorecem o estabelecimento de CA, pois são responsáveis pela adesão como mucinas,
513 estaterinas e proteínas ricas em prolina (TORRES *et al.*, 2007; ELGUEZABAL *et al.*, 2008;
514 PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2009.; NETT *et al.*, 2010) o que pode explicar o
515 crescimento do biofilme nas aplicações do colostro durante a inoculação fúngica.

516 A identificação dos componentes específicos do leite materno representa um assunto de
517 grande interesse atualmente, principalmente os relacionados com os oligossacarídeos. Os
518 resultados dos ensaios mostraram que a 3' Sialolactose quando aplicada antes e durante a
519 inoculação microbiana reduzem a formação do biofilme de ambos micro-organismos testados, o
520 que não aconteceu quando o oligossacarídeo foi aplicado após o biofilme estar formado,
521 mostrando que este oligossacarídeo pode tanto interferir na adesão inicial, bem como na
522 proliferação microbiana. O leite materno contém altas concentrações e uma grande
523 variabilidade de oligossacarídeos (NEWBURG *et al.*, 2005), especialmente associado ao ácido
524 siálico denominado “sialyloligosaccharides” (ASAKUMA *et al.*, 2007). Estes oligossacarídeos
525 parecem estar envolvidos na defesa contra micro-organismos patogênicos e contribuem para o
526 desenvolvimento do sistema imune (DAI *et al.*, 2000). Vários micro-organismos patogênicos
527 como *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori* reconhecem receptores ligantes de ácido siálico.
528 Os componentes de ácido siálico no leite humano têm, portanto, uma função como um análogo
529 de receptor solúvel para inibir a ligação destes patógenos nos receptores de superfícies celulares

530 (KUNZ *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2002). Estudo recente mostra que oligossacarídeos de leite
531 humano podem reduzir a virulência de *C. albicans* tendo um papel importante na proteção da
532 mucosa intestinal de neonatos (GONIA *et al.*, 2015).

533 Diante do exposto, o colostro humano interfere no início da adesão microbiana e na sua
534 proliferação e atua de forma específica de acordo com o micro-organismo na desestruturação do
535 biofilme já formado. Os oligossacarídeos são componentes do colostro que atuam na fase inicial
536 de formação e desenvolvimento do biofilme microbiano; mas, não interferem, no biofilme já
537 formado.

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552 7. CONCLUSÕES

553 Os resultados dos ensaios de SM permitiram concluir que:

554

555 - A aplicação de colostro antes do inóculo não alterou a adesão de SM e o biofilme se
556 desenvolve da mesma maneira que o controle;

557 - O colostro interferiu no crescimento de SM, pois o biofilme diminui de volume após
558 24 horas da presença do colostro;

559 - A saliva promoveu um aumento da biomassa de SM;

560 - A 3´ Sialolactose interferiu na adesão e crescimento de biofilme de SM.

561

562 Os resultados dos ensaios de CA permitiram concluir que:

563

564 - A aplicação de colostro, antes do inóculo, não alterou a adesão de CA e o biofilme se
565 desenvolve da mesma maneira que o controle;

566 - O colostro não interferiu no crescimento de CA; pois a biomassa do biofilme não se
567 altera após 24 horas da presença do colostro;

568 - A saliva promoveu uma diminuição da biomassa de CA;

569 - A 3´ Sialolactose interferiu na adesão e crescimento de biofilme de CA.

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 580 1. AHN, S. J. *et al.* Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of
581 saliva. **Infection and Immunity**[S.I.], v. 76, n. 9, p. 4259-68, Sep 2008.
- 582 2. AICHER, W. K. *et al.* Properties of IgA-binding receptors on murine T cells: relative
583 importance of Fc alpha R, beta-galactosyltransferase and anti-secretory component reactive
584 proteins (ASCP). **Scandinavian Journal of Immunology**[S.I.], v. 35, n. 4, p. 469-86, Apr 1992.
- 585 3. ALLISON, L. M. *et al.* Effect of Human Milk and its Components on *Streptococcus Mutans*
586 Biofilm Formation. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**[S.I.], v. 39, n. 3, p. 255-61,
587 Spring 2015.
- 588 4. ALVES, A. C. *et al.* Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission
589 in nursery school children. **Journal of Medical Microbiology**[S.I.], v. 58, n. Pt 4, p. 476-81,
590 Apr 2009.
- 591 5. ASAKUMA, S. *et al.* Sialyl oligosaccharides of human colostrum: changes in concentration
592 during the first three days of lactation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**[S.I.], v.
593 71, n. 6, p. 1447-51, Jun 2007.
- 594 6. BERKOWITZ, R. J. *et al.* Primary oral infaction of infants with *Streptococcus mutans*. **Archives**
595 **of oral biology** [S.I.], v. 25, n. 4, p. 221-4, 1980.
- 596 7. BIKKER, F. J. *et al.* Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin
597 (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. **The Journal**
598 **of Biological Chemistry**[S.I.], v. 277, n. 35, p. 32109-15, Aug 30 2002.
- 599 8. BOEHM, G.; STAHL, B. Oligosaccharides from milk. **The Journal of Nutrition**[S.I.], v. 137, n.
600 3 Suppl 2, p. 847S-9S, Mar 2007.
- 601 9. BORGES, M. C. *et al.* Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm
602 children: a prospective study. **Archives of Oral Biology**[S.I.], v. 60, n. 1, p. 116-25, Jan 2015.
- 603 10. BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant.
604 **Vaccine**[S.I.], v. 21, n. 24, p. 3382-8, Jul 28 2003.
- 605 11. CLAPP, D. W. Developmental regulation of the immune system. **Seminars in**
606 **Perinatology**[S.I.], v. 30, n. 2, p. 69-72, Apr 2006.
- 607 12. COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low
608 pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**[S.I.], v. 67, n. 3, p. 429-53, table
609 of contents, Sep 2003.
- 610 13. DAI, D. *et al.* Role of oligosaccharides and glycoconjugates in intestinal host defense. **Journal**
611 **of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**[S.I.], v. 30 Suppl 2, p. S23-33, 2000.
- 612 14. DANIELSSON NIEMI, L. *et al.* Human milk compounds inhibiting adhesion of mutans
613 streptococci to host ligand-coated hydroxyapatite in vitro. **Caries Research** [S.I.], v. 43, n. 3, p.
614 171-8, 2009.
- 615 15. DE ROSSI, T. L., MAB; DA SILVA, RV; FERNANDES, EV; GERALDINO, TH; COSTA, IC.
616 ET AL. . Interactions Between *Candida albicans* and Host. **Seminário: Ciências Biológicas e da**
617 **Saúde**[S.I.], v. 32(1), p. 15-28., 2011.
- 618 16. DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant
619 microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**[S.I.], v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002.
- 620 17. EIWEGGER, T. *et al.* Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides
621 stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. **Pediatric research**[S.I.], v. 56, n. 4,
622 p. 536-40, Oct 2004.

- 623 18. ELGUEZABAL, N. *et al.* Whole Saliva has a Dual Role on the Adherence of *Candida albicans*
624 to Polymethylmetacrylate. **The open dentistry journal**[S.I.], v. 2, p. 1-4, 2008.
- 625 19. FALSETTA, M. L. *et al.* Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida*
626 *albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infection and immunity**[S.I.], v. 82, n.
627 5, p. 1968-81, May 2014.
- 628 20. FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health
629 care. **Caries Research**[S.I.], v. 38, n. 3, p. 182-91, May-Jun 2004.
- 630 21. GIBBONS, R. J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. **Journal of**
631 **Dental Research**[S.I.], v. 68, n. 5, p. 750-60, May 1989.
- 632 22. GOLDMAN, A. S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and
633 immunomodulating properties. **The Pediatric Infectious Disease Journal**[S.I.], v. 12, n. 8, p.
634 664-71, Aug 1993.
- 635 23. GONIA, S. *et al.* Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human
636 Premature Intestinal Epithelial Cells. **The Journal of Nutrition**[S.I.], v. 145, n. 9, p. 1992-8, Sep
637 2015.
- 638 24. GUDIÉL-URBANO, M.; GONI, I. Human milk oligosaccharides. The rule in the health and
639 development of the infants. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**[S.I.], v. 51, n. 4, p. 332-
640 9, Dec 2001.
- 641 25. HANSON, L. A. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity.
642 **Annals of Allergy, Asthma & Immunology : official publication of the American College of**
643 **Allergy, Asthma, & Immunology**[S.I.], v. 81, n. 6, p. 523-33; quiz 533-4, 537, Dec 1998.
- 644 26. HANSON, L. A.; KOROTKOVA, M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal
645 infection. **Seminars in Neonatology: SN**[S.I.], v. 7, n. 4, p. 275-81, Aug 2002.
- 646 27. HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk.
647 **Nutrients**[S.I.], v. 3, n. 4, p. 442-74, Apr 2011.
- 648 28. IDOTA, T. *et al.* Inhibition of cholera toxin by human milk fractions and sialyllactose.
649 **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**[S.I.], v. 59, n. 3, p. 417-9, Mar 1995.
- 650 29. 2. JALASVUORI, H. *et al.* Probiotic *Lactobacillus reuteri* strains ATCC PTA 5289 and ATCC
651 55730 differ in their cariogenic properties in vitro. **Archives of Oral Biology**[S.I.], v. 57, n. 12,
652 p. 1633-8, Dec 2012.
- 653 30. JAROSZ, L. M. *et al.* *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida*
654 *albicans* hypha formation. **Eukaryotic Cell**[S.I.], v. 8, n. 11, p. 1658-64, Nov 2009.
- 655 31. JOUAULT, T. *et al.* Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay
656 leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**[S.I.], v. 11, n. 7, p.
657 1007-15, Jul 2009.
- 658 32. KIDD, E. A.; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious
659 enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. **Journal of Dental**
660 **Research**[S.I.], v. 83 Spec No C, p. C35-8, 2004.
- 661 33. KLEIN, M. I. *et al.* Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus*
662 *mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **Journal of Clinical**
663 **Microbiology**[S.I.], v. 42, n. 10, p. 4620-6, Oct 2004.
- 664 34. KLEINEGGER, C. L. *et al.* Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a
665 function of host age. **Journal of Clinical Microbiology**[S.I.], v. 34, n. 9, p. 2246-54, Sep 1996.
- 666 35. KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. **Acta**
667 **Paediatrica** [S.I.], v. 82, n. 11, p. 903-12, Nov 1993.

- 668 36. KUNZ, C. *et al.* Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. **Annual Review of Nutrition**[S.I.], v. 20, p. 699-722, 2000.
669
- 670 37. LI, Y. *et al.* The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with
671 breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Research**[S.I.], v. 34, n. 2, p. 123-32,
672 Mar-Apr 2000.
- 673 38. LIM, C. S. *et al.* Candida and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of**
674 **Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society**
675 **of Clinical Microbiology** [S.I.], v. 31, n. 1, p. 21-31, Jan 2012.
- 676 39. MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary
677 immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**[S.I.], v. 62, n. 1,
678 p. 71-109, Mar 1998.
- 679 40. MARTIN, M. J. *et al.* Binding of milk oligosaccharides by several enterotoxigenic *Escherichia*
680 *coli* strains isolated from calves. **Glycoconjugate Journal**[S.I.], v. 19, n. 1, p. 5-11, Jan 2002.
- 681 41. MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old
682 Brazilian children over a one-year follow-up period. **Journal of Public Health Dentistry** [S.I.],
683 v. 61, n. 3, p. 161-7, Summer 2001.
- 684 42. MICHETTI, P. *et al.* Production and use of monoclonal IgA antibodies complexed with
685 recombinant secretory component for passive mucosal protection. **Advances in Experimental**
686 **Medicine and Biology**[S.I.], v. 310, p. 183-5, 1991.
- 687 43. NETT, J. E. *et al.* Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture
688 model. **Infection and Immunity**[S.I.], v. 78, n. 9, p. 3650-9, Sep 2010.
- 689 44. NEWBURG, D. S. *et al.* Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein gp120
690 binding to its host cell CD4 receptor. **The Journal of nutrition** [S.I.], v. 125, n. 3, p. 419-24,
691 Mar 1995.
- 692 45. NEWBURG, D. S. *et al.* Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. **Annual**
693 **Review of Nutrition**[S.I.], v. 25, p. 37-58, 2005.
- 694 46. NIKAWA, H. *et al.* The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida*
695 *krusei*. **Archives of Oral Biology**[S.I.], v. 38, n. 12, p. 1057-63, Dec 1993.
- 696 47. OLIVEIRA, C. E. *Candida albicans* e estomatite por dentadura: avaliação da presença do fungo
697 na lesão, na prótese total superior e no sangue. **Dissertação (Mestrado Odontologia – área de**
698 **Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de Bauru**[S.I.], p. 79f. , 2009.
699
- 700 48. OVONO ABESSOLO, F. *et al.*[Profile of immunoglobulins A, G, and M during breast milk
701 maturation in a tropical area (Gabon)]. **Santé: Cahiers D'étude et de Recherches**
702 **Francophones**[S.I.], v. 21, n. 1, p. 15-9, Jan-Mar 2011.
- 703 49. PEREIRA-CENCI, T. *et al.*Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights.
704 **Journal of Applied Oral Science : Revista FOB**[S.I.], v. 16, n. 2, p. 86-94, Mar-Apr 2008.
- 705 50. PEREIRA, C. A. Efeitos da Terapia Fotodinâmica *in vitro* em Biofilmes formados por *Candida*
706 *albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. **Dissertação (Mestrado em**
707 **Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade**
708 **Estadual Paulista, São José dos Campos**[S.I.], 2009.
- 709 51. PETRECHEN, L. N. *et al.* Levels and complexity of IgA antibody against oral bacteria in
710 samples of human colostrum. **Immunobiology**[S.I.], v. 220, n. 1, p. 142-6, Jan 2015.
- 711 52. RAJENDRAN, R. *et al.* Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans*
712 biofilm formation from patients with type 1 diabetes. **Mycopathologia**[S.I.], v. 170, n. 4, p. 229-
713 35, Oct 2010.

- 714 53. RUDLOFF, S. *et al.* Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human
715 milk. **European Journal of Nutrition**[S.I.], v. 41, n. 2, p. 85-92, Apr 2002.
- 716 54. RUSSELL, C.; LAY, K. M. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of
717 infants. **Archives of Oral Biology**[S.I.], v. 18, n. 8, p. 957-62, Aug 1973.
- 718 55. RUSSELL, M. W. *et al.* Protein antigens of *Streptococcus mutans*: purification and properties of
719 a double antigen and its protease-resistant component. **Infection and Immunity**[S.I.], v. 28, n.
720 2, p. 486-93, May 1980.
- 721 56. SALONE, L. R. *et al.* Breastfeeding: an overview of oral and general health benefits. **The**
722 **Journal of the American Dental Association** [S.I.], v. 144, n. 2, p. 143-51, Feb 2013.
- 723 57. SAMARANAYAKE, L. P. *et al.* Oral mucosal fungal infections. **Periodontology 2000**[S.I.], v.
724 49, p. 39-59, Feb 2009.
- 725 58. SANTOS, J. D. *et al.* Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of
726 microbial interactions. **Brazilian Oral Research**[S.I.], v. 30, 2016.
- 727 59. SELWITZ, R. H. *et al.* Dental caries. **Lancet**[S.I.], v. 369, n. 9555, p. 51-9, Jan 6 2007.
- 728 60. SHIRTLIFF, M. E. *et al.* Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS**
729 **Microbiology Letters**[S.I.], v. 299, n. 1, p. 1-8, Oct 2009.
- 730 61. SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. **Critical**
731 **Reviews in Oral Biology and Medicine : an Official Publication of the American**
732 **Association of Oral Biologists** [S.I.], v. 3, n. 1-2, p. 109-33, 1992.
- 733 62. STECKSEN-BLICKS, C. *et al.* Prevalence of oral *Candida* in the first year of life.
734 **Mycoses**[S.I.], v. 58, n. 9, p. 550-6, Sep 2015.
- 735 63. SZIEGOLEIT, F. *et al.* Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to
736 carious teeth on oral colonization by *Candida*. **Medical Mycology**[S.I.], v. 37, n. 5, p. 345-50,
737 Oct 1999.
- 738 64. TANNER, A. C. *et al.* Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their
739 caregivers in a population-based study. **Oral Microbiology and Immunology**[S.I.], v. 17, n. 6,
740 p. 379-87, Dec 2002.
- 741 65. TAUDORF, E. *et al.* Secretory IgA response in oral immunotherapy. Investigation in birch
742 pollinosis. **Allergy**[S.I.], v. 49, n. 9, p. 760-5, Oct 1994.
- 743 66. THAM, R. *et al.* Breastfeeding and the risk of dental caries: a systematic review and meta-
744 analysis. **Acta Paediatrica** [S.I.], v. 104, n. 467, p. 62-84, Dec 2015.
- 745 67. THEIN, Z. M. *et al.* Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review.
746 **Mycoses**[S.I.], v. 52, n. 6, p. 467-75, Nov 2009.
- 747 68. THYLSTRUP, A. F., O. Cariologia clínica. v. 3 edição, 421p., 2001.
- 748 69. TOBGI, R. S. *et al.* In vitro susceptibility of *Candida* species to lysozyme. **Oral Microbiology**
749 **and Immunology**[S.I.], v. 3, n. 1, p. 35-9, Mar 1988.
- 750 70. TORRES, S. R. *et al.* A prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in
751 patients with hyposalivation. **Brazilian Oral Research**[S.I.], v. 21, n. 2, p. 182-7, Apr-Jun 2007.
- 752 71. VAN DE VEERDONK, F. L. *et al.* Pathogenesis of invasive candidiasis. **Current Opinion in**
753 **Critical Care**[S.I.], v. 16, n. 5, p. 453-9, Oct 2010.
- 754 72. VASCONCELOS, L. C. S., SAMPAIO, F.C. ; SAMPAIO, M.C.C ; PEREIRA, M.S.V. ;
755 PEIXOTO, M.H.P. *Streptococcus mutans* in denture stomatitis patient sunder antifungal therapy.
756 **Revista Odonto Ciência, João Pessoa** [S.I.], v. v. 25, n. 21, p. 120-125, 2010.

- 757 73. VELUSAMY, S. K. *et al.* Protective effects of human lactoferrin during *Aggregatibacter*
758 *actinomycetemcomitans*-induced bacteremia in lactoferrin-deficient mice. **Antimicrobial**
759 **Agents and Chemotherapy**[S.I.], v. 58, n. 1, p. 397-404, 2014.
- 760 74. VICTORA, C. G. *et al.* Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and
761 lifelong effect. **Lancet** [S.I.], v. 387, n. 10017, p. 475-90, Jan 30 2016.
- 762 75. WENZEL, R. P.; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the
763 intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies.
764 **Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of**
765 **America**[S.I.], v. 41 Suppl 6, p. S389-93, Sep 15 2005.
- 766 76. WERNERSSON, J. *et al.* Effects of human milk on adhesion of *Streptococcus mutans* to saliva-
767 coated hydroxyapatite in vitro. **Caries Research**[S.I.], v. 40, n. 5, p. 412-7, 2006.
- 768 77. WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral**
769 **Microbiology**[S.I.], v. 3, 2011.
- 770 78. WILLIAMS, D. W. *et al.* *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention.
771 **Periodontology 2000**[S.I.], v. 55, n. 1, p. 250-65, Feb 2011.
- 772 79. YAMASHIRO, Y. *et al.* Possible biological growth factors in breast milk and postnatal
773 development of the gastrointestinal tract. **Acta Paediatrica Japonica**[S.I.], v. 31, n. 4, p. 417-
774 23, Aug 1989.
- 775 80. ZIJNGE, V. *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS One**[S.I.], v. 5, n. 2, p. e9321,
776 2010.
- 777
- 778
- 779
- 780
- 781
- 782
- 783
- 784
- 785
- 786
- 787
- 788
- 789
- 790
- 791
- 792
- 793
- 794

795 ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – HC / FMRP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 16 de março de 2011

Ofício nº 850/2011
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“INFLUÊNCIA MATERNA NO DESENVOLVIMENTO E NA ATIVIDADE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MUCOSA CONTRA PATÓGENOS ORAIS NO INÍCIO DA VIDA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 319ª Reunião Ordinária realizada em 14/03/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13290/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
RUCHELE DIAS NOGUEIRA
PROFª. DRª. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI(Supervisora)
Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

798 ANEXO B – QUESTIONÁRIO

Prematuro: Não Sim

799

800	Maternidade: _____	Data: ____/____/____
801	Número da ficha: _____	
802	Nome do bebê: _____	
803	Nome da Mãe: _____	nasc: ____/____/____
804	Nome do Pai: _____	nasc: ____/____/____
805	Endereço: _____	
806	Telefone para contato: _____	

807

808	DADOS MATERNOS
809	1. Perfil racial: 1. () branco 2. () negro 3. () mulato 4. () amarelo 5. () índio 6. () outros _____
810	
811	2. Grau de instrução da mãe: 1. () sem escolaridade 2. () 1º grau completo 3. () 1º grau incompleto
812	
813	4. () 2º grau completo 5. () 2º grau incompleto 6. () superior
814	3. Renda familiar: R\$ _____/mês
815	4. Qual foi o tipo de parto? 1. () cesárea 2. () normal
816	5. Qual o tempo de gestação? _____ semanas
817	6. Complicações durante gravidez? 1. () Sim 2. () Não Se sim, pq? _____
818	
819	7. Realizou Pré-Natal? 1. () Sim 2. () Não Se sim, qual número de consultas? _____
820	
821	8. Utilizou-se de medicação durante a gestação? 1. () Sim 2. () Não Se sim, o motivo? _____
822	
823	9. Frequenta regularmente o dentista? 1. () Sim 2. () Não Se sim, quando foi a última? _____
824	
825	10. Apresenta dor em algum dente? 1. () Sim 2. () Não Qual? _____
826	
827	11. Quantas vezes você escova os dentes por dia? () 1 () 2 () 3 () 4 ou mais
828	12. Seus dentes sangram durante a higiene? 1. () Sim 2. () Não
829	13. Possui próteses dentais? 1. () Sim 2. () Não Tipo: _____
830	

831

832	DADOS DA CRIANÇA RECÉM NASCIDA dia(s) de vida: _____ Idade gestacional: _____
833	semanas
834	Data nasc.: ____/____/____ Sexo: () F () M Peso: _____Kg Estatura: _____
835	cm
836	1. Perfil racial: 1. () branco 2. () negro 3. () mulato 4. () amarelo 5. () índio 6. () outros _____
837	
838	2. Amamenta ou amamentou seu filho(a)? 1. () Sim 2. () Não
839	

840

841

842

843

844