

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
BÁRBARA BELLOCCHIO BERTOLDO

**Estudo comparativo da resposta de anticorpos IgA em amostras do sistema  
imune de mucosas contra espécies de estreptococos orais.**

Uberaba  
2015

BÁRBARA BELLOCCHIO BERTOLDO

**Estudo comparativo da resposta de anticorpos IgA de amostras de leite materno e saliva contra espécies de estreptococos orais.**

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

2015

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

**Bertoldo, Bárbara Bellocchio.**

B462e      Estudo comparativo da resposta de anticorpos IgA em amostras do sistema imune de mucosas contra espécies de estreptococos orais / Bárbara Bellocchio Bertoldo. – Uberaba, 2015.  
40 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2015.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins.

1. Streptococcus mutans. 2. Saliva. 3. Colostro. 4. Cáries dentárias. 5. Imunoglobulina A. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

CDD 617.6



## DEDICATÓRIA

À Deus, em primeiro lugar sempre, sem Ele nada sou.

Aos meus pais Arnaldo e Vanda, pois de nada adiantaria minha caminhada se vocês não tivessem me ensinado os primeiros passos. Em todo o percurso, vocês estiveram presentes, mostrando-me a importância do estudo para ser uma excelente profissional. Pai, Mãe, vocês são exemplos de vida e essa vitória também é de vocês.

À Lara irmã companheira, que sempre esteve ao meu lado durante toda a minha caminhada.

Ao meu namorado Renan pelo apoio, compreensão, amor e incentivo sempre.

A todos os meus familiares que me incentivaram a vencer os desafios.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha orientadora Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins a quem devo agradecer pela amizade, carinho e a confiança na realização do trabalho. Seus ensinamentos, seus conselhos, sua capacidade intelectual e principalmente sua clareza nas orientações sempre foi fator importante durante o período de construção desse trabalho. Para sempre serei grata ao seu apoio e cultivarei intenso respeito e admiração.

Muito Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

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

A 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, minha eterna gratidão pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos colegas do curso de Mestrado pela convivência e as experiências trocadas.

As minhas amigas do laboratório Camila, Rayanne, Aline e Karina pela colaboração nos procedimentos laboratoriais, pela amizade e os bons momentos que passamos juntas

A secretaria do curso de pós-graduação e extensão Flávia Michele da Silva pela prontidão em atender.

A todos os funcionários da Universidade Uberaba agradeço pelo trabalho executado.

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

Enfim, a todos o meu muito obrigada!

## RESUMO

O presente estudo concentra-se na comparação dos padrões de resposta IgA contra estreptococos orais no colostro e em amostras de salivas e aborda, especificamente o papel da imunidade da mucosa na susceptibilidade à doença cárie e a importância da proteção imunológica passiva fornecida através do aleitamento materno no início da vida. Este estudo envolveu 62 amostras de colostro (C) e salivas maternas (MS) e, ainda, salivas dos seus respectivos recém-nascidos (BS). A coleta foi realizada logo após o nascimento, enquanto que amostras das mães (C e MS) foram coletadas 12 horas após a cesariana. A especificidade de IgA contra extratos de *Streptococcus mutans* (SM) e *S. mitis* (SMI) foram analisados por *Western blot*. Os números médios de bandas reativas foi de 5,6 (DP: 3,1), 3,7 (DP: 2,2) e 2,9 (DP: 1,8) para C, MS e BS respectivamente. Apenas 30% das amostras dos bebês apresentaram IgA-reativo contra SM, enquanto que 74 e 80% de MS e C, respectivamente apresentaram tal resposta. As análises da reatividade de IgA contra antígenos (Ag) de virulência de SM (Ag I/II, GTF e GbpB) das amostras com resposta positiva não mostraram diferenças na frequência de resposta a Ag I/II ( $p>0,05$ ), mas houve algumas diferenças na IgA reativos para GTF e, especialmente, para GbpB. A resposta positiva de IgA-reativa para GTF foi significativamente diferente entre C e MS salivas ( $p<0,05$ ) em que 90 e 58%, respectivamente, apresentaram essa resposta, mas não diferiu de BS ( $p>0,05$ ). O GbpB foi o menos reconhecido pelas amostras, 48 e 26% das amostras de C e MS apresentaram IgA reativo ( $p>0,05$ ) enquanto apenas 5% do BS apresentaram tal anticorpo. A análise comparativa da semelhança dos padrões de resposta de IgA para SM, em MS e C, mostrou que apenas 8% das amostras apresentaram bandas idênticas ao mesmo tempo. Dessa forma a presença de IgA contra GbpB, que foi encontrado em pequenas quantidades em BS pode influenciar o processo de acumulação por SM. Além disso, as diferenças de resposta de IgA encontrados entre C e MS pode ser devido a diferentes formas de estimulação, proliferação e transporte de IgA nestas secreções. Dessa forma foi visto que as amostras maternas C e MS apresentaram anticorpos IgA contra antígenos de SM e SMI, e que uma minoria de amostras de BS apresentaram anticorpos contra essas bactérias o que não era esperado, pois os recém nascidos não apresentam essas bactérias logo ao nascimento, e aleitamento materno exclusivo até os 6 meses é de fundamental importância para conferir proteção ao lactente especialmente pela transferência de anticorpos IgA anti-GbpB.

**Palavras-chave:** *Streptococcus mutans*, saliva, colostro, cárie dentária, Imunoglobulina A

## ABSTRACT

The present study focuses on comparison of patterns of IgA response against oral streptococci in colostrum and salivas' samples and specifically addresses the role of mucosal immunity in susceptibility to caries disease and the importance of the passive immune protection provided by the mother early in life. This study involved 62 samples of colostrum (C) and salivas of mothers (MS) and also, salivas from theirs respective newborns (babies'salivas, BS). The collection of babies was performed soon after the birth when the mothers' samples (C and MS) were collected 12 hours after cesarean. The specificity of IgA against extracts of *Streptococcus mutans* (SM) and *S. mitis* (SMI) were analyzed by the western blot. The samples were normalized by the amount of IgA and protein. The mean numbers of reactive bands were 5.6 (SD: 3.1), 3.7 (SD: 2.2) and 2.9 (SD: 1.8) to C, MS and BS respectively. Only 30% of babies samples, when 74 and 80% of MS and C, respectively presented IgA-reactive to SM. The analysis of reactivity of IgA to antigens (Ags) of virulence of SM (Ag I/II, Gtf and GbpB) of samples with positive response shows no differences in the frequency of response to Ag I/II ( $p>0.05$ ), but there were some differences in the IgA reactive to Gtf and especially to GbpB. The positive response of IgA-reactive to Gtf was different between C and MS salivas ( $p<0.05$ ) in which 90 and 58% respectively presented this response, but did not differ of SB ( $p>0,05$ ). The GbpB was the least recognized by the samples, 48 and 26% of samples of C and MS presenting IgA reactive ( $p>0.05$ ) when only 5% of BS presented this antibody. The comparative analysis of similarity of the patterns of IgA response to SM, in MS and C, showed that only 8% of those samples presented identical bands in the same time. So, the breastfeeding by ingestion of colostrum can protect the babies against the installation and specially, the accumulation process of SM, mainly by presence of IgA against GbpB, which was found in low amounts in BS. Also, the differences of IgA response found between C and MS can be due to the different ways of stimulation, proliferation and transportation of IgA in those secretions.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, saliva, colostrum, IgA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>16</b>
3.1 Objetivos específicos .....	16
<b>4. MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>17</b>
4.1. Delineamento do estudo.....	17
4.2. Coleta de amostras .....	17
4.3. Ensaios para análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos de SM e SMI.....	18
4.3.1. Preparação de antígenos bacterianos. ....	18
4.3.2 Análise da complexidade da resposta de IgA contra antígenos bacterianos em ensaios de Western blot. ....	18
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>20</b>
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
6.1. Resposta de IgA contra antígenos bacterianos .....	21
6.2. Análise comparativa dos padrões de resposta IgA para SM.....	24
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>34</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral representa uma porta de entrada importante de vários micro-organismos. Alguns destes podem se tornar residentes e outros transitórios permitindo a adesão e a acumulação de outros novos micro-organismos, aumentando a complexidade das comunidades microbianas na cavidade oral.

Estreptococos como *Streptococcus mitis* (SMI) representam a maioria das bactérias que colonizam o inicialmente a cavidade oral (Pearce *et al*, 1995; Hohwy *et al*, 2001; Seow *et al*, 2009). Após a erupção dentária novas espécies passam a colonizar esta cavidade, como *Streptococcus mutans* (SM) (Smith *et al*, 1998; Caufield *et al*, 1993), embora essas espécies também podem ser detectadas antes da erupção dentária, em crianças fortemente expostas a SM (Alves *et al*, 2009). Alguns principais antígenos (Ags) associados às células de SM foram mostrados como envolvidos na capacidade desses micro-organismos de se aderir e acumular no biofilme dentário, promovendo o desenvolvimento de cárie dentária, tais como Antígeno I/II (Ag I/II), glicosiltransferase (GTF) e proteína ligante de glucano (GbpB) (Lee *et al*, 1988; Smith *et al*, 1996; Yamashita *et al*, 1993). Vários estudos demonstraram que a indução de anticorpos específicos contra cada um destes antígenos pode conferir proteção contra o desenvolvimento de cáries dentárias em modelos animais (Koga *et al*, 2002). Estes estudos deram impulsos para a utilização destes antígenos em ensaios clínicos de elaboração de vacinas anti-cárie em adultos e crianças (Childers *et al*, 1999).

A fase inicial da colonização do SM inicia-se com sua adesão ao dente, um evento que é independente de sacarose e resulta da interação específica de adesinas bacterianas com glicoproteínas salivares que cobrem os dentes. Esse processo de aderência e colonização é intermediado por proteínas, enzimas e complexos enzimáticos (Banas & Vickerman, 2003; Miranda *et al*, 2001; Islam & Khan, 2007). Dentre as adesinas de SM, destacam-se o receptor de superfície SpaP (também conhecido como Pac ou Antígeno I/II) (Jenkinson & Demuth, 1997). De acordo com Banas e Vickerman (2003), o SM produz pelo menos quatro

tipos distintos de proteínas ligantes aos glucanos, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. As Gbps principalmente GbpB são importantes para o acúmulo de SM na presença de sacarose, pois formam uma "ponte" que liga as superfícies celulares destes micro-organismos à matriz celular de glucanos sintetizadas pelas GTFs. *S. mutans* produz, pelo menos, três GTFs geneticamente distintas: GTFB que sintetiza glucanos insolúveis; GTFC produz uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis, enquanto GTFD forma predominantemente glucanos solúveis (Aoki et al, 1986; Hanada & Kuramitsu, 1989).

Para controlar este desafio microbiano no início da vida e se manter saudável, o recém nascido necessita de vários componentes do sistema imunológico que podem ser adquiridos através de seu próprio repertório imunológico. A primeira linha de defesa da cavidade oral é representado pelo sistema imune da mucosa que tem vários fatores imunológicos, mas especialmente a IgA secretora (IgAS). A função destes anticorpos é agir localmente, promovendo um revestimento protetor nas superfícies mucosas da criança. Esta imunoglobulina pode ser associada ao controle de microbiota bucal por reduzir a aderência de bactérias na mucosa e dentes (Clapp, 2006). Os anticorpos secretores da classe IgA apresentam uma estrutura peculiar, extremamente adaptada para agir nas condições das superfícies mucosas: é geralmente polimérica (dimérica ou trimérica), estando associada à cadeia J (sintetizada pelos plasmócitos) e ao componente secretor (produzido pela célula epitelial), constituindo um complexo tetra ou pentamolecular, com alta avidéz para ligação com antígenos e maior resistência à ação de enzimas proteolíticas, abundantes nas secreções mucosas (Brandtzaeg, 1995; Russel e Kilian, 1999). Estes anticorpos IgAS são produzidos por plasmócitos presentes na lâmina própria subjacente ao epitélio e são liberados geralmente como dímeros ligados à cadeia J nas proximidades da porção basolateral das células epiteliais, onde estão presentes os receptores para imunoglobulina polimérica (Brandtzaeg, 1995)

Os estudos prospectivos anteriores com crianças de 5 a 24 meses de idade, fortemente expostos à SM mostraram um padrão complexo de IgAS salivar contra os antígenos de SM, sugerindo que as respostas contra estes antígenos associados à virulência de SM, especialmente contra GbpB, cedo na vida, podem influenciar a capacidade de SM em colonizar a cavidade oral. (Nogueira *et al*, 2005; Nogueira *et al*, 2007). Assim, a resposta de IgA salivar contra a GbpB pode modular a infecção por SM. Salivas de crianças com níveis indetectáveis de SM, mostrou que os níveis de IgA foram detectados no nascimento (Nogueira *et al*, 2012) e 16% das amostras apresentaram IgA reativo a Ag I/II e GTF, mas não apresentaram um IgA reativo para GbpB (Nogueira *et al*, 2012). Após 3 meses, não houve diferenças nos níveis de IgA reativos para GTF e Ag I/II, mas 7% das crianças apresentaram resposta IgA salivar para GbpB (Borges *et al*, 2015).

No entanto, o repertório imunológico próprio do recém nascido está em desenvolvimento a medida que este entra em contato com micro-organismos do ambiente. Sendo assim, a imunização passiva, conferida pelo aleitamento materno, representa uma importante fonte de componentes do sistema imunológico para as membranas mucosas do recém-nascido, principalmente pela transferência de IgAS que representam o principal mediador da atividade anti-bacteriana no colostro humano (Pribylova *et al*, 2012; Ovono Abessolo *et al*, 2011; Bertoldo *et al*, 2012). Diversos estudos demonstraram a proteção passiva conferida pelo leite materno contra infecções bacterianas através dos processos de ligação e também por ocupação de superfícies mucosas, impedindo a aderência e invasão de uma grande variedade de micro-organismos patogênicos (Bertoldo *et al*, 2012; Van de Perre, 2003).

O reconhecimento de anticorpos anti-bacterianos fornecidos pelo leite materno é de grande interesse, uma vez que permite a compreensão da função destes no controle pós-natal da flora normal ou patogênica do trato gastrointestinal em desenvolvimento. Os anticorpos

IgA no leite materno são dirigidos contra micróbios e proteínas dos alimentos aos quais a mãe foi exposta e que as crianças também podem entrar em contato (Tomicic et al, 2010).

Estudos anteriores mostraram que a maioria das amostras de colostro analisados tinham níveis detectáveis de IgA para Ags de SM, mas contra a GbpB foi significativamente mais baixa em comparação com os outros antígenos detectados (Petrechen *et al*, 2015). Assim, o leite materno, a partir primeiras horas após o nascimento apresentaram níveis significativos de IgA específicos contra importantes antígenos de virulência de estreptococos orais, o que pode atrapalhar o processo instalação e acumulação desses micro-organismos na cavidade oral (Petrechen *et al*, 2015).

Há pouca informação sobre a resposta imune de mucosas contra micro-organismos orais durante as fases iniciais do desafio bacteriano de SM e a função de IgA do leite materno contra a instalação dessas bactérias. É possível que alguns dos fatores possam afetar a resposta imune inicial contra espécies pioneiras comensais da cavidade oral, como SMI, e influenciar os padrões de desenvolvimento da resposta imune e conseqüentemente a susceptibilidade à colonização.

## **2. HIPÓTESE**

A hipótese do presente estudo é a de que as amostras maternas de colostro e saliva apresentem IgA contra as bactérias colonizadoras orais (SM e SMI), o que não ocorre para amostras do neonato.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi analisar e comparar os níveis e a resposta de anticorpos IgAS presentes no colostro, saliva da mãe e saliva do neonato contra antígenos específicos de espécies bacterianas colonizadores da cavidade oral: SM e SMI a fim de verificar a proteção imunológica passiva oferecida pela mãe no início da vida.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Analisar a presença de IgA contra antígenos de SM e SMI
- Comparar a resposta de IgA contra SM e SMI nas amostras
- Comparar a resposta de IgA entre as amostras.
- Avaliar a presença de IgA contra antígenos específicos de SM.

## **4. MATERIAL E METODOS**

### **4.1. Delineamento do estudo**

Um total de 62 pares de mães e recém-nascidos foram incluídos neste estudo, sob o consentimento para a sua participação. O Comitê de Ética da UNIUBE (anexo 1), aprovou este estudo. Para ser incluído na população do estudo, foram incluídos somente as mães saudáveis com menos de 24 horas após a cesariana. Informações de saúde materna e gestacional foram obtidas através de entrevistas com a mãe. No primeiro dia de internação as mães foram entrevistadas e após as cesáreas, salivas do recém-nascido foram obtidos. Amostras das mães (C e MS) foram coletadas após 12 horas do parto na MATER (Centro De Referência Em Saúde Da Mulher do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo). Estas amostras foram processadas e analisadas nos Laboratórios de Biopatologia e de Microbiologia da UNIUBE.

### **4.2. Coleta de amostras**

As amostras de colostro foram coletadas por expressão manual tubos estéreis tipo Falcon nas primeiras 12 horas após o parto. Após a coleta, as amostras maternas foram transportadas em gelo para o laboratório, centrifugado a 1300 g durante 7 minutos para remover os componentes lipídicos e armazenadas a -80°C até o uso. Amostras de saliva não-estimulada foram coletadas por meio de pipetas de transferência de polipropileno estéril. As salivas do recém nascido foram realizadas em 5 minutos após o nascimento. Solução de EDTA 250 mM, pH 5,2 (Sigma, St Louis, MO, EUA) foram adicionados a cada amostra antes do seu transporte em gelo para o laboratório onde foram armazenados a -80°C até à análise.

### **4.3. Ensaio para análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos de SM e SMI**

#### **4.3.1. Preparação de antígenos bacterianos**

Os padrões de reatividade de anticorpos IgA contra antígenos de SM (UA159) e SMI (ATCC506) foram utilizados para os ensaios de Western blot. Os antígenos foram extraídos de culturas destes micro-organismos em caldo Todd Hewith (Difco, CA, USA) obtidas após incubação a 37°C durante 48 horas. Células de 15ml das culturas com absorbâncias ajustadas para  $A_{600nm}=1$  foram então separadas através de centrifugação a 1.000 x g a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e os precipitados de células acrescidos de água destilada e de tampão desnaturante 0,25M Tris HCl pH 6.8 (contendo 8% SDS, 20% de ditiotreitol 1M, 30% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) na proporção de células de 1ml de cultura para 15ul de H<sub>2</sub>O e 15ul de tampão desnaturante. As suspensões celulares foram então fervidas durante 5 minutos para extração das proteínas e inativação de proteinases. A seguir os extratos foram imediatamente colocados em banho de gelo e congelados a -80°C. Para monitoramento do padrão de antígenos destes extratos, alíquotas dos mesmos foram analisadas em géis de poliacrilamida-SDS corados com Coomassie Blue R 250.

#### **4.3.2 Análise da complexidade da resposta de IgA contra antígenos bacterianos em ensaios de Western blot**

Os experimentos de *western blot* foram realizados com alíquotas das salivas e leite estocadas a -80°C. Para isto, proteínas das preparações de antígenos descritas acima foram separadas por 3 horas a 24 mA/gel em géis de poliacrilamida-SDS a 6% e preparados com auxílio de sistema de mini-géis Mini Protean II (BioRad, CA, USA). Após separação eletroforética das proteínas nos géis em duplicata, um destes foi corado com Coomassie Blue R250 (Sigma, IL, USA) para análise do padrão dos antígenos separados e o outro foi

transferido para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, CA, EUA) durante 1,5 horas a 50V constantes, com auxílio de aparato Mini Trans Blot (Bio Rad) e posteriormente corada com Red Ponceau, para verificação da transferência. Padrões de pesos moleculares pré-corados (BioRad) foram incluídos em todos os géis.

As membranas de nitrocelulose contendo os antígenos bacterianos foram então bloqueadas através de incubação a 4°C “overnight” com tampão de bloqueio TBST (100mM Tris com 10% Tween) pH 7.5 contendo 5% de leite desnatado. A seguir, as mesmas foram incubadas com as salivas materna diluídas 1:4000, saliva neonato 1:100 e de leite 1:20000 no mesmo tampão durante 2 horas, a temperatura ambiente e sob agitação. Como controles negativos, membranas duplicata foram incubadas apenas com TBST mais 5% de leite e como controle positivo, as membranas foram incubadas com saliva de um adulto cujo padrão de resposta aos antígenos estudados já havia sido estabelecido anteriormente (Nogueira et al., 2007). Após 6 lavagens de 5 minutos cada com TBST pH 7.5, as membranas foram incubadas por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente, com de anticorpo purificado de cabra anti-IgA humana conjugado com peroxidase (Zymed/Invitrogen, NJ, USA), diluído 1:4000 em TBST com 5% de leite. Nova série de 6 lavagens durante 5 minutos cada foi então realizada. A seguir, as reações com anticorpo secundário foram reveladas usando-se o sistema quimioluminescente ECL (Amersham, CA, USA).

As bandas de antígenos reconhecidos por IgA foram detectadas através da exposição de filmes de raios X (Kodak, NY, USA) às membranas durante 5 minutos. Após a revelação dos filmes sensibilizados, imagens digitais de alta resolução dos mesmos foram capturadas em *scanner* de densitometria (BioRad), para obtenção das medidas de intensidade das bandas reativas.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

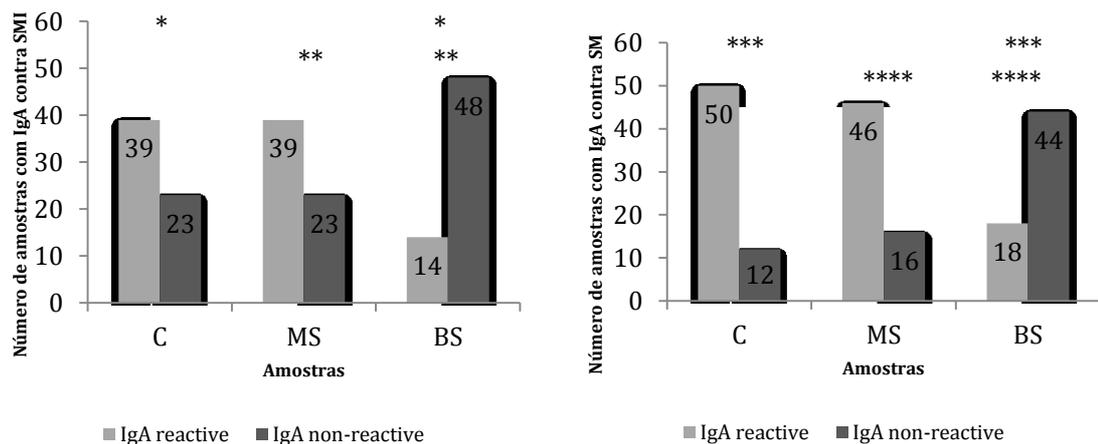
Para cálculo de normalidade foi utilizado o teste de D'Agostino-Pearson. As comparações das frequências de amostras com diferentes especificidades de anticorpos IgA contra SM e SMI foram submetidos a um teste do qui-quadrado. O número médio de bandas de IgA reativos contra os Ags foi também determinada e comparada entre os antígenos e amostras e testadas por ANOVA. As correlações entre as concentrações de IgA específica e padrões de reações de anticorpos entre as amostras foram testadas por análise de correlação de Pearson. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resposta de IgA contra antígenos bacterianos

O número de amostras (C, MS e BS) com resposta de IgA positivo e negativo para SM e SMI foi mostrado na Figura 1. A maior parte das amostras de C e também MS apresentou maior aumento IgA reativo a SM não diferindo estatisticamente em ambos grupos ( $p < 0.05$ ) o que não aconteceu para SMI ( $p > 0.05$ ) pois a quantidade de resposta positiva foi parecido com a negativa. Em torno de 29 (n=18) e 22,6 (n=14) % de BS apresentou IgA reativos a SM e SMI respectivamente, sendo estatisticamente maior e significativa a resposta negativa a estas bactérias ( $p < 0.05$ ). Não houve diferenças no número de amostras com resposta positivas de IgA contra SM e SMI nas amostras maternas (C e MS) ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, a frequência de IgA positivo para SM e SMI foi maior em ambas as amostras maternas quando comparadas com o grupo BS ( $p < 0,001$ ).

Figura 1. Número de amostras de C (colostró), MS (Saliva materna) e BS (saliva do recém nascido) com IgA reativo ou não a SMI (*Streptococcus mitis*) e a SM (*S. mutans*).



\* Qui-quadrado,  $p < 0.01$ ,  $q = 23.2$

\*\* Qui-quadrado,  $p < 0.01$ ,  $q = 23.2$

\*\*\* Qui-quadrado,  $p < 0.01$ ,  $q = 33.3$

\*\*\*\* Qui-quadrado,  $p < 0.01$ ,  $q = 25.3$

O número médio de bandas reativas em cada amostra e a frequência de resposta positiva para cada um dos antígenos virulência de SM (Ag I/II, GTF e GbpB) nas amostras de C (n=50), MS (n=40), BS (n=16) que apresentaram resposta de IgA positiva a SM foi indicado na tabela 1. Os números médios de bandas de IgA-reativas foram significativamente diferentes entre as amostras ( $p < 0,021$ ), sendo que a complexidade da resposta IgA a SM maior em C, seguido de MS e BS. Em geral, os antígenos mais frequentemente reconhecidos pelo IgA foram Ag I/II e GTF, em que, mais de 60% das amostras apresentou tal reatividade. Não houve diferença na frequência de reatividade aos antígenos GTF e Ag I/II entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Mas, entre os antígenos, a GbpB foi menos detectada (Tabela 1,  $p < 0,01$ ,  $q > 14,6$ ). A análise dentro dos grupos (C, MS e BS) da resposta de IgA contra os antígenos de SM mostrou que a frequência de resposta positiva de IgA contra Ag I/II e GTF foram estatisticamente maiores do que o negativo ( $p < 0,05$ ), o que não aconteceu com GbpB. Por exemplo, no C, as frequências de resposta positiva e negativa foram parecidas, enquanto que em MS e BS, o número de amostras com IgA negativos foi estatisticamente maior do que positivo ( $p > 0,05$ ).

A Tabela 1, também, permite comparar a frequência de resposta de IgA entre as diferentes amostras. A frequência de resposta de IgA a Ag I/II foi parecida e não diferente estatisticamente entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Mas, houve várias diferenças significativas entre a resposta IgA para GTF e GbpB. A positividade das amostras com IgA reativos para GTF foi diferente entre C e MS ( $p < 0,001$ ,  $q = 18,8$ ) e BS ( $p < 0,001$ ,  $q = 28,9$ ), pois o colostro mostrou um maior número de amostras com IgA reativo para GTF do que nas demais. No entanto, esta diferença não foi encontrada entre amostras de salivas maternas e do recém nascido (BS e MS;  $p = 0,29$ ). Para GpbB, a frequência de amostras com positividade de IgA foi menos frequente do que para outros antígenos nas amostras ( $p < 0,05$ ); especialmente em BS, em que, apenas 5,6% das amostras apresentaram IgA reativos para GbpB, enquanto 36,9 e 50,0% de MS e C, respectivamente, demonstraram tal resposta. Houve diferenças

estatisticamente significativas entre as frequências de número de amostras com IgA reativos para GbpB entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1. Número e porcentagem de amostras positivas a SM de C (colostro), MS (Saliva materna) e BS (saliva do recém nascido) reativas ou não aos antígenos de virulência de SM (Ag I/II, GTF e GbpB). Número médio de bandas reativas e o DP (desvio padrão) de acordo com os grupos testados.

<i>SM Ags:</i>	Número (%) de amostras:					
	C (n=50)		MS (n=46)		BS (n=18)	
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>
Ag I/II	47 (94.0)	3 (6.0) <sup>1</sup>	39 (84.8)	7 (15.2) <sup>3</sup>	16 (88.9)	2 (11.1) <sup>5</sup>
Gtf	48 (96.0)	2 (4.0) <sup>2,7,8</sup>	36 (78.3)	10 (27.1) <sup>4,7</sup>	12 (66.7)	6 (33.3) <sup>6,8</sup>
GbpB	25 (50.0)	25 (50.0) <sup>1,2,9</sup>	17 (36.9)	29 (63.1) <sup>3,4,10</sup>	1 (5.6)	17 (94.4) <sup>5,6,9,10</sup>
<i>Número médio de bandas reativas ± DP</i>	4.48 ± 3.57 <sup>11,12</sup>		2.69 ± 2.49 <sup>11,13</sup>		0.87 ± 1.64 <sup>12,13</sup>	

<sup>1</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 24.0$

<sup>2</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 26.8$

<sup>3</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 22.0$

<sup>4</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 16.0$

<sup>5</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 25.0$

<sup>6</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 14.5$

<sup>7</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 18.9$

<sup>8</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 28.3$

<sup>9</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 49.1$

<sup>10</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ,  $q = 29.3$

<sup>11</sup> ANOVA,  $p = 0.021$

<sup>12</sup> ANOVA,  $p = 0.001$

<sup>13</sup> ANOVA,  $p = 0.001$

A Tabela 2 mostra o número médio de bandas reativas em cada amostra e a frequência de resposta positiva para um antígeno de virulência de SMI de aproximadamente 56kDa, nas amostras de C (n=39), MS (n=39), BS (n=14) que apresentaram resposta IgA positivo para esta bactéria. Os números médios de bandas IgA-reativas foram significativamente diferentes entre as amostras de MS e C, em comparação com a BS ( $p < 0,006$ ), mas não entre C e MS ( $p = 0,08$ ). A complexidade da resposta IgA para SMI foi

maior no C e MS do que em BS. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as frequências de amostras com IgA reativos ao antígeno de 56 kDa-Ag ( $p>0,05$ ).

Tabela 2. Número e porcentagem de amostras positivas a SMI de C (colostro), MS (Saliva materna) e BS (saliva do recém nascido) reativas ou não ao antígeno de virulência de SMI (56kDa-Ag). Número médio de bandas reativas e o DP (desvio padrão) de acordo com os grupos testados.

<i>SMI antígenos:</i>	Número (%) de amostras:					
	C (n=39)		MS (n=39)		BS (n=14)	
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>
56 kDa Ag	35 (89.7)	4 (10.3)	33 (84.6)	6 (15.4)	12 (85.7)	2 (14.3)
<i>Número médio de bandas reativas ± DP</i>	1.68 ± 2.07 <sup>1</sup>	-	1.73 ± 1.89 <sup>2</sup>	-	0.71 ± 1.77 <sup>1,2</sup>	-

<sup>1</sup> ANOVA,  $p<0,05$

<sup>2</sup> ANOVA,  $p<0,05$

## 6.2. Análise comparativa dos padrões de resposta IgA para SM

A Figura 2 mostra um diagrama de resposta IgA a SM e SMI e seus antígenos de virulência em C, MS e BS. A análise do padrão e da similaridade de resposta de IgA contra SM, entre amostras, indica que houve uma correlação positiva entre a resposta positiva a SM e Ag I/II ( $p <0,05$ ,  $r > 0,79$ ) e SM e GTF ( $p<0,05$ ,  $r>0,69$ ) em todas as amostras. Uma correlação positiva entre a resposta de IgA a SM e GbpB em MS e C ( $p<0,05$ ,  $r > 0,36$ ), mas não em BS ( $p>0,05$ ). Entre os grupos de amostras, apenas houve uma correlação positiva entre C e MS na resposta IgA para SM ( $p=0,03$ ,  $r=0,27$ ) e MS e BS na resposta IgA para GTF ( $p=0,003$ ,  $r=0,36$ ).



A análise comparativa da semelhança dos padrões de resposta de IgA para SM, em MS e C, mostrou que apenas 8% das amostras apresentaram bandas idênticas ao mesmo tempo e 9,6% das amostras não apresentaram nenhuma banda de um em todas as amostras. Amostras de C e MS apresentou algumas semelhanças na resposta ao SM, por exemplos, 48 pares de C e MS (77,4%) apresentaram a mesma resposta a SM, o que não ocorreu quando as comparações foram realizadas entre MS e BS (43,5%), C e BS (38,7%), C e BS e MS (29,0%).

A Tabela 3 mostra o número de amostras que apresentaram, ao mesmo tempo, semelhança ou não na resposta de IgA para os antígenos específicos de uma virulência SM. Na Tabela 4 mostra, também, o número de pares de amostras que apresentam, ao mesmo tempo, semelhança ou não na resposta de IgA, mas contra dois ou todos os antígenos de virulência de SM. A resposta foi considerada como semelhante na presença (+) ou ausência (-) de IgA específico para os antígenos. O número de C e MS que apresentaram resposta positiva semelhante ao Ag I/II e GTF foi mais elevado do que para os outros antígenos e quando comparados com BS (Tabela 3,  $p < 0,05$ ). A resposta positiva de IgA contra GTF e Ag I/II, ao mesmo tempo, nas amostras de C e MS, mostrou um perfil, pois 29 pares apresentaram esta resposta (Tabela 4,  $p < 0,05$ ). Em geral a resposta a GbpB é diferente e reconhecida por um número reduzido de amostras, o que contribuiu para os números elevados de amostras pares com a mesma resposta negativa a GbpB ( $p < 0,05$ , Tabela 3) e uma diminuição do número de pares, com a resposta de IgA semelhante à GbpB e aos outros antígenos no mesmo tempo ( $p < 0,05$ , Tabela 4).

Tabela 3. Número de amostras com similar resposta de IgA contra antígenos de SM em amostras de C (colostro), MS (Saliva materna) e BS (saliva do recém nascido).

<b>Número de amostras com similar resposta de IgA contra antígenos de SM:</b>									
<b>Amostras</b>	<b>Ag I/II</b>			<b>Gtf</b>			<b>GbpB</b>		
	Sim		Não	Sim		Não	Sim		Não
	+	-		+	-		+	-	
C e MS	30	9	23	31	9	22	11	32	19
MS e BS	12	18	32	11	24	27	0	45	17
BS e C	11	10	41	9	11	42	1	37	24
BS e MS e C	9	7	46	8	9	45	0	31	31

Tabela 4. Número de amostras com similar resposta de IgA em amostras de C (colostro), MS (Saliva materna) e BS (saliva do recém nascido) contra antígenos de SM.

<b>Número de amostras com resposta de IgA similares entre os grupos:</b>									
<b>Resposta de IgA contra os Ags de SM:</b>	<b>C e MS</b>			<b>MS e BS</b>			<b>C e BS</b>		
	Sim		Não	Sim		Não	Sim		Não
	+	-		+	-		+	-	
Ag I/II e Gtf	29	7	26	11	16	35	8	10	44
Gtf e GbpB	5	7	50	0	19	43	1	10	51
Ag I/II e GbpB	7	6	49	0	15	47	1	10	51
Ag I/II e Gtf e GbpB	5	6	51	0	13	49	1	9	52

## 7. DISCUSSÃO

A cavidade oral é a porta de entrada para inúmeros microrganismos que podem colonizar e determinar o aparecimento de várias doenças, com manifestações locais, como cárie dentária, bem como as sistêmicas, como as endocardites. Frente a esta invasão, a resposta imune de mucosas, própria do recém nascido, representa a principal fonte de componentes imunológicos inatos e adaptativos. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta de IgA salivar contra bactérias envolvidas na cárie, como SM.

Resultados prévios com as mesmas amostras mostraram que a concentração média de IgA do C, equivalente à 2.850,2 ( $\pm$  2567,2)  $\mu\text{g/mL}$  foi compatível com os dados da literatura que variam entre 1340  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  (Ovono Abessolo *et al.*, 2011) a 3200  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  (Mickleson & Moriarty, 1982). Já a concentração de IgA em MS foi de 435,2 ( $\pm$  86,7), valor também parecidos com os dados da literatura, os quais variam entre 7200 a 410  $\mu\text{g/ml}$  (Brandtzaeg, 1989; Wan *et al*, 2003). Por fim, a média de concentração de IgA do BS logo ao nascimento, foi de 2,4 ( $\pm$  7,6)  $\mu\text{g/mL}$ , sendo menor da concentração encontrada em crianças de 10 horas de vida que foi de 3,02 ( $\pm$ 9.34)  $\mu\text{g/ml}$  (Nogueira *et al*, 2012). Desta maneira, as concentrações de IgA são maiores significativamente no colostro, seguidas pelas salivas materna e do bebê, o que é compatível com o tipo de secreção e a maturação do sistema de mucosa. Previamente, dados de um estudo prospectivo mostraram que do nascimento aos três primeiros meses, os níveis de IgA salivares aumentaram cerca de 2.4 vezes (Borges *et al*, 2015).

É de crucial importância investigar a transferência de anticorpos para o recém-nascido, pois este tem, o seu repertório imunológico em desenvolvimento e o aleitamento materno representa uma importante arma contra variadas manifestações infecciosas. Os resultados demonstraram que a presença de anticorpos IgA contra SM foi maior significativamente do que a sua ausência, tanto no C quanto em MS (Figura 1). Para SMI, a positividade de resposta de IgA também foi maior em C e MS, mas não houve diferenças

estatisticamente significantes. A análise do número de bandas reativas configura que a complexidade de resposta de C foi significativamente maior do que em MS. Por outro lado, em BS, houve um maior número de amostras com ausência de IgA reativo às duas bactérias, diferenciando das amostras maternas. Nossos resultados sugerem que, embora o sistema imune de mucosas esteja em desenvolvimento, existe produção própria de IgAS do recém nascido, especialmente contra bactérias colonizadores iniciais (como SMI). As menores concentrações de IgA no recém-nascido advêm de várias deficiências imunológicas decorrentes da imaturidade fisiológica do sistema imune, justifica-se portanto a importância do aleitamento materno para que estes recém-nascidos possam receber os anticorpos necessários (Lopez & Junior, 2010). Estudos recentes, demonstram que o aleitamento materno pode suprimir esta falta de anticorpos próprios do neonato, já que amostras de colostro apresentam elevados níveis de IgA contra os principais antígenos de SM (Petrechen *et al*, 2015).

De modo geral, a presença de IgA contra SM e SMI foi mais frequente nas amostras maternas do que no recém nascido. Estes resultados sugerem que as diferenças encontradas podem estar associadas à presença destas bactérias na cavidade bucal no momento da coleta ou por um período de tempo, como estimuladoras, já que os adultos são, em sua maioria colonizados, enquanto que ao nascer e na ausência de dentes, este microrganismo não colonizam a cavidade bucal.

Os resultados aqui apresentados corroboram com estudos prévios com a mesma população (Nogueira *et al*, 2012, Borges *et al*, 2015), pois muitas crianças do presente estudo, apresentaram IgA contra SM, mesmo na ausência de detecção deste microrganismo. E ainda, a forma de coleta, antes do primeiro aleitamento materno, refutam as hipóteses e dúvidas previamente levantadas, nestes estudos anteriores, de que estes anticorpos detectados nas salivas, não eram próprios do recém nascidos, mas sim de origem materna,

devido a uma concentração residual do leite materno, mesmo que coletados após 3 horas (Nogueira *et al*, 2012; Borges *et al.*, 2015).

Sendo assim, uma outra hipótese que justifica a presença de IgA na saliva do neonato, seria a de que há uma transferência de antígenos bacterianos orais da mãe para o recém-nascido através do sangue do cordão umbilical. Alguns estudos na literatura sugerem que os recém nascidos não são completamente estéreis e que existe um efluxo de bactérias comensais de mãe para filho (Martín *et al*, 2003) na vida intra uterina. Jiménez e colaboradores 2005 identificaram, em amostras de sangue do cordão umbilical, a presença de *Enterococcus*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus sanguinis*. Curiosamente, estas espécies estão presentes em crianças desde os primeiros dias de vida e são geralmente consideradas como organismos comensais em crianças saudáveis, embora em algumas delas possam causar infecções oportunistas (Martín *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2005). Outros estudos mostraram, em recém-nascidos, a presença de citomegalovírus (Endo *et al*, 2009) e papilomavírus (Rombaldi *et al*, 2009) em amostras de sangue de cordão umbilical. Desta forma, as espécies de bactérias testadas, no presente estudo, poderiam ter sido apresentadas ao feto na vida intra-uterina e, assim, estimulando o desenvolvimento do sistema imune de mucosa.

*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). Sabe-se ainda, que o SM possui três grupos de antígenos associados à superfície celular que participam do seu processo de aderência e acúmulo no biofilme dentário, sendo alvos de estudos para elaboração de vacinas anticárie, que são eles: AgI/II, GTF e GbpB. Os resultados apontaram que a maioria das amostras apresentaram resposta positiva de IgA contra Ag I/II e GTF. Elevados níveis de IgA contra GTF e Ag I/II também foram encontrados em amostras salivares de crianças de 5 a 11 meses, (Nogueira *et al*, 2007), em crianças ao nascimento

(Nogueira *et al*, 2012) e aos três meses de idade (Borges *et al*, 2015), independente da colonização por SM. E, também em amostras de colostro (Petrechen *et al*, 2015).

Por outro lado, a resposta contra GbpB foi diferente, ou seja, a maioria das amostras tiveram uma resposta negativa de IgA a este antígeno, especialmente nas amostras salivares. A virulência do SM está relacionada, dentre outros mecanismos, a sua habilidade de sintetizar GbpB, um grupo heterogêneo de proteínas que promovem a adesão celular à superfície dos dentes (Hoshino *et al*. 2012). Sendo assim, estudos sobre a resposta imune natural contra esta proteína pode dar indícios de sua importância e seu comportamento imunogênico, especialmente por que, estudos prévios revelaram que a resposta positiva de IgA contra GbpB, em amostras salivares, foi mais frequentes em crianças não colonizadas pelo SM (Nogueira *et al.*, 2007).

Dentre as amostras, não houve diferenças na quantidade de IgA contra Ag I/II, mas a prevalência de amostras com IgA-anti GTF e GbpB foram marcantes, ou seja, o colostro apresentou níveis superiores que as demais amostras, especialmente BS, justificando assim a importância do aleitamento materno contra a colonização oral no início da vida.

Presumidamente, os anticorpos que aparecem nestas secreções são derivados da exposição antigênica dos tecidos linfoides associados do intestino e do trato respiratório superior o que resulta em tráfego de linfócitos B sensibilizados de GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), através de linfonodos mesentéricos para a circulação. Estas células antígeno-sensibilizadas, em seguida, migram para diversos sítios do corpo, incluindo o tecido mamário e glândulas salivares (Brandtzaeg, 2003). Pouco se sabe, sobre a sensibilização dos antígenos de SM no sistema imune de mucosas e os resultados do presente estudo sugerem alguns pontos importantes. Primeiramente a maior presença de anticorpos contra SM em C e MS pode estar relacionada a presença do microrganismo colonizando a cavidade bucal de adultos, o que não acontece em BS, justificando, assim uma menor presença de IgA contra SM. Interessantemente a Figura 2 e as Tabelas 3 e 4

revelam informações promissoras para a literatura e o entendimento das vias de estimulação das mucosas. Nas amostras MS e C houve uma correlação positiva entre a resposta de IgA a SM total e seus antígenos. Em BS, houve uma correlação positiva entre IgA contra SM e GTF e Ag I/II mas não contra a GbpB. Supondo-se que a estimulação, seja por via intra-uterina, esta proteína não é transferida e não estimula o sistema imune do feto, o que justifica uma menor quantidade de anticorpos salivares contra a GbpB. A medida que a criança cresce e é exposta, ao SM, os anticorpos IgA anti GbpB tornam-se detectáveis aos 3 meses (como descrito por Borges *et al.*, 2015) e importantes para a modulação da infecção aos 6 meses de vida, como reportado por Nogueira e colaboradores (2007).

## 8. CONCLUSÕES

As amostras maternas C e MS apresentaram anticorpos IgA contra antígenos de SM e SMI, e uma minoria de amostras de BS apresentaram anticorpos contra essas bactérias.

Assim os dados apresentados, permitem-nos concluir que:

- A maioria das amostras estudadas de C e MS apresentaram anticorpos IgA contra antígenos de SM e SMI comumente encontrados na cavidade bucal.
- A minoria das salivas dos recém nascidos contém anticorpos IgA específicos a SM e SMI
- O estímulo ao aleitamento materno, sobretudo o de caráter exclusivo até os 6 meses de idade, é de fundamental importância para conferir proteção imunológica ao lactente contra o desafio infeccioso oral, especialmente pela transferência de anticorpos IgA anti-GbpB;
- As vias de estimulação do sistema imune de mucosas pareceram ser diferentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES AC, NOGUEIRA RD, STIPP RN, PAMPOLINI F, MORAES A B, GONÇALVES RB, HÖFLING JF, LI Y, MATTOS-GRANER RO. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. **J Med Microbiol**, v. 58, n. 4, p- 476-478, 2009.
2. BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral *streptococci*. **Crit Ver Oral Biol Med**, v. 14, p- 89-99, 2003
3. BERTOLDO BB, CORRÊA NFSB, NOGUEIRA RD. Influência do aleitamento materno no estabelecimento de microrganismos cariogênico e desenvolvimento de cárie. **Unopar**, v. 15, n. 4, p- 1-8, 2012.
4. BORGES MC, SESSO ML, ROBERTI LR, DE MENEZES OLIVEIRA MA, NOGUEIRA RD, GERALDO-MARTINS VR, FERRIANI VP. Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: a prospective study. **Archives of Oral Biology**, v. 60, p. 116-125, 2015
5. BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in extracellular Matrix formation of Cariogenic Biofilms. **Caries Res**, v. 45, p- 69-86, 2011.
6. BRANDTZAEG, P. Overview of the mucosal immune system. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.146, p- 13-25, 1989.
7. BRANDTZAEG P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. **APMIS**, v.103, p- 1-19, 1995.
8. BRATTHALL, D.; KOHLER, B. *Streptococcus mutans* serotypes: some aspects of their identification; distribution; antigenic shifts; and relationship to caries. **J DentRes**, v. 55, p- 15-21, 1976.
9. BURNE, R.A. Oral streptococci, products of their environment. **J Dent Res** v. 77, p- 445-452,1998.
10. CARNEIRO-SAMPAIO MMS, SILVA MLM, CARBONARE SB, PALMEIRA P, DELNERI MT, HONÓRIO AC, ET AL. Breast-feeding protection against enteropathogenic *Escherichia coli*. **Rev Microbiol São Paulo**, v. 26, p- 151-4, 1996
11. CAUFIELD PW, CUTTER GR, DASANAYAKE AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res**, v. 72, n. 1, p-37-45, 1993.
12. CHILDERS, N. K., G. TONG, S. MITCHELL, K. KIRK, M. W. RUSSELL, AND S. M.MICHALEK. A controlled clinical study of the effect of nasal immuniza- tion with a

*Streptococcus mutans* antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses. **Infect. Immun**, v. 67, p- 618-623, 1999.

13. CLAPP DW. Developmental regulation of the immune system. **Semin Perinatol**, v. 30, n.2, p- 69-72, 2006.

14. ENDO, T., GOTO, K., ITO, K., SUGIURA, T., TERABE, K., CHO, S., NISHIYAMA, M., SUGIYAMA, K., TOGARI, H. Detection of congenital cytomegalovirus infection using umbilical cord blood samples in a screening survey. **J Med Virol**, v. 81, p- 1773-1776, 2009.

15. HOHWY J, REINHOLDT J, KILIAN M. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. **Infect Immun**, v.69, n.10, p- 6055-6063, 2001.

16. HOSHINO T, FUJIWARA T, KAWABATA S. Evolution of cariogenic character in *Streptococcus Mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. **Sci Rep**. p- 2-518, 2012.

17. ISLAM, B.; KHAN, A. V. Dental caries: from infection to prevention. **Med Sci Monit**, v. 13, n. 11, p- 196-203, 2007

18. JENKINSON, H. F.; DEMUTH, D. R. Structure, function and immunogenicity of *streptococcal* antigen I/II polypeptides. **Mol Microbiol**, v. 23, p- 183-190, 1997.

19. JIMÉNEZ E, FERNÁNDEZ L, MARÍN ML, MARTÍN R, ODRIOZOLA JM, NUENO-PALOP C, NARBAD A, OLIVARES M, XAUS J, RODRÍGUEZ JM. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Curr Microbiol** , v. 51, n. 4, p- 270-274, 2005.

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

21. KURAMITSU, H.K. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. *Curr Issues Mol Biol*, v. 3, p- 35-36, 2001.

22. LEE, S.F., PROGULSKE-FOX, A., BLEIWEIS, A.S. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen. P1 (I/II), in *Escherichia coli*. **Infect. Immun**. v. 56, p- 2114–2119, 1988.

23. MARTÍN, R., LANGA, S., REVIRIEGO, C., JIMÉNEZ, E., MARÍN, M. L., XAUS, J., FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ, J. M. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **J Pediatr**, v. 143, p- 754-758, 2003.

24. MICKLESON, K.N., MORIARTY, K.M. Immunoglobulin levels in human colostrum and milk. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v.1, n.3, p.381-384,1982.

25. MIRANDA, J. L.; ANDRADE, E. S. S.; SOUZA, G. F. M.; ALVES, R. D.; ALMEIDA, D.; PINTO, L. P. Vacinação: uma opção preventiva contra a cárie dental

aprimorada pelos conhecimentos da Imunologia e da Biotecnologia. **Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v. 4, n. 1, p- 67-76, 2001

26. NOGUEIRA R D, ALVES AC, KING WF, GONCALVES RB, HÖFLING JF, SMITH DJ, MATTOS-GRANER RO. Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. **Clin Vaccine Immunol** v. 6, n. 14, p-804-807, 2007.

27. NOGUEIRA RD, ALVES AC, NAPIMOGA MH, SMITH DJ, MATTOS-GRANER RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. **Infect Immun** v.9, n. 73, p- 5675-5684, 2005.

28. NOGUEIRA, R.D., SESSO, M.L., BORGES, M.C., MATTOS-GRANER, R.O., SMITH, D.J., FERRIANI, V.P. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. **Arch. Oral. Biol.** v. 57, p- 647–653, 2012.

29. OVONO ABESSOLO, F., ESSOMO OWONO MEGNE-MBO, M., ATEGBO, S., N'NEGUE, M.A., LENDOYE, E.. Profile of immunoglobulins A, G, and M during breast milk maturation in a tropical area (Gabon). **Sante** v. 21, p- 15–19, 2011

30. PEARCE C, BOWDEN GH, EVANS M, FITZSIMMONS SP, JOHNSON J, SHERIDAN MJ, WIENTZEN R, COLE MF. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. **J Med Microbiol**, v. 42, n. 1, p- 67-72, 1995.

31. PETRECHEN, L. N.; ZAGO, F. H.; SESSO, M. L. T.; BERTOLDO, B. B.; SILVA, C. B.; AZEVEDO, K. P.; LIMA PEREIRA, S. A.; GERALDO-MARTINS, V. R.; FERRIANI, V. P. L.; NOGUEIRA, R. D. Levels and complexity of IgA antibody against oral bacteria in samples of human colostrums. **Immunobiology**, v. 220, p- 142-146, 2014.

32. PRIBYLOVA, J., KRAUSOVA, K., KOCOURKOVA, I., ET AL. Colostrum of healthy mothers contains broad spectrum of secretory IgA autoantibodies. **J. Clin. Immunol**, v. 32, p- 1372–1380, 2012.

33. ROMBALDI, R. L.; SERAFINI, E. P.; MANDELLI, J.; ZIMMERMANN, E.; LOSQUIAVO, K. P. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. **Virology**, v. 21, p- 6- 83, 2009.

34. RUSSEL MW, KILIAN M, LAMM ME. Biological activities of IgA. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, eds. **Mucosal Immunology. 2nd ed. Academic Press**, p- 225-240, 1999

35. SEOW WK; LAM JH; TSANG AK; HOLCOMBE T; BIRD PS. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. **Int J Paediatr Dent** , v. 19, n. 6, p- 406-11, 2009.

36. SMITH DJ, KING WF, AKITA H, TAUBMAN MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol Immunol*, v. 13, n. 5, p- 278-285, 1998.
37. 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*, v. 64, p- 3069–3073, 1996.
38. TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J. Microbiology of dental caries. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, p- 408-421, 2005.
39. TOMIČIĆ, S., JOHANSSON, G., VOOR, T., BJÖRKSTÉN, B., BÖTTCHER, M.F., JENMALM, M.C. Breast milk cytokine and IgA composition differ in Estonian and Swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatr Res* v.68, n.4, p.330-4, 2010.
40. VAN DE PERRE, P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* v. 21, p- 3374–3376, 2003.
41. WAN, A. K.; 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*, v. 18, p- 72-78, 2003
42. YAMASHITA Y, BOWEN WH, BURNE RA, KURAMITSU HK. Role of the Streptococcus mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun*, v. 61, n. 38, p- 7-11, 1993.

## ANEXO

UNIVERSIDADE DE UBERABA -  
UNIUBE



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo comparativo da variabilidade de anticorpos IgA específicos e colonização microbiana em amostras de leite e saliva de puérperas de boa saúde geral.

**Pesquisador:** Ruchele Dias Nogueira

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 15669413.6.0000.5145

**Instituição Proponente:** Universidade de Uberaba - UNIUBE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 640.974

**Data da Relatoria:** 24/04/2014

**Apresentação do Projeto:**

O projeto intitulado: Estudo comparativo da variabilidade de anticorpos IgA específicos e colonização microbiana em amostras de leite e saliva de puérperas de boa saúde geral, busca encontrar evidências de que a colonização oral possa influenciar a diversidade de anticorpos do leite materno e também da saliva. Também busca verificar e comparar a diversidade e complexidade de anticorpos específicos contra colonizadores orais em dois nichos do sistema imune de mucosas. Finalmente, busca encontrar informações a respeito do estímulo antigênico de microrganismos orais na vida pós natal pela presença destes em amostras de leite materno.

De acordo com a metodologia do estudo serão avaliadas amostras de saliva e leite materno de 50 parturientes coletadas previamente na Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto Mater. Para tanto, os níveis de microrganismos comumente encontrados na cavidade bucal serão analisados através de ensaios de Checkerboard, os níveis de imunoglobulinas através da Técnica ELISA e as especificidades de resposta de anticorpos IgA contra bactérias cariogênicas através do Western Blot.

**Critério de Inclusão:**

Gestantes de boa saúde geral, sem utilização prévia de corticóides ou antibióticos

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801  
**Bairro:** Universitário **CEP:** 38.055-500  
**UF:** MG **Município:** UBERABA  
**Telefone:** (34)3319-8811 **Fax:** (34)3314-8910 **E-mail:** cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 640.974

**Critério de Exclusão:**

(1) partos não realizados na Mater, (2) má saúde geral, (3) alguma intercorrência durante o parto (3) uso de medicamentos como antibióticos e corticóides. Quanto às crianças serão excluídas aquelas que apresentem: (1) idade superior a 1 dia de vida; (2) malformações congênitas; (3) instabilidade cardiorespiratória; (4) tratamento prévio com corticóides ou antibióticos; (5) sinais clínicos de infecção. Análise dos dados: As variações dos níveis de imunoglobulinas serão analisadas através da análise de correlação de Pearson e teste de variância não paramétrico.

Para análise dos microrganismos detectáveis nas amostras através da Hibridização DNA-DNA checkerboard será utilizado o teste ANOVA. Os padrões de complexidade de resposta imune verificado nos ensaios de western blot também serão quantificados através do número de antígenos distintos identificados das diferentes espécies bacterianas testadas e das intensidades das reações medidas através da densitometria das bandas reconhecidas e correlacionados entre eles e entre as visitas e amostras. Os dados obtidos através do questionário aplicado serão utilizados para caracterização da amostra estudada e controle de outros fatores de possível influência na maturação do sistema imune de mucosas avaliados pelo questionário.

**Objetivo da Pesquisa:**

**1. OBJETIVOS GERAIS**

Correlacionar a presença de microrganismos cariogênicos em amostras de leite materno e saliva e a diversidade de anticorpos produzidos e suas especificidades por estas duas amostras.

**2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar nas amostras de saliva materna e no leite materno a presença de espécies de microrganismos orais: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 29667), *S. gordonii* (ATCC 10558), *Streptococcus mutans* (ATCC 31341), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Lactobacillus casei* (ATCC 334)

- Avaliar os níveis de anticorpos IgA e suas especificidades aos antígenos de *Streptococcus mutans* em amostras de saliva materna;

- Comparar os imunoenaios de leite materno encontrados em estudo prévio com os anticorpos IgAS encontrados em amostras de leite materno.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os benefícios superam os riscos (coletas pouco invasivas e indolores). No que diz respeito aos benefícios, os participantes serão instruídos sobre a importância da prevenção de doença oral materna durante a gestação e do desenvolvimento de cárie dentária precocemente na criança.

**Endereço:** Av. Nene Sabino, 1801  
**Bairro:** Universitário **CEP:** 38.055-500  
**UF:** MG **Município:** UBERABA  
**Telefone:** (34)3319-8811 **Fax:** (34)3314-8910 **E-mail:** cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 640.974

Também será demonstrado, no próprio bebê, como higienizar a boca da criança, após as mamadas com auxílio de uma gaze estéril. Além de instrução quanto a possível transmissão de microrganismos de mães para filhos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é pertinente e atendeu as solicitações anteriormente.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os demais termos foram apresentados e estão adequados

1) Adequar o TCLE quanto a proposta do estudo; foi apresentado o TCLE este apresenta-se conforme a deliberação da RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012; Entretanto sugere-se uma reformulação na primeira pagina, segundo paragrafo, onde se lê: "...no início da vida através do início da vida e pode trazer como benefícios para a conscientização e reafirmar a importância da amamentação nos primeiros meses de vida..." e no final do terceiro paragrafo onde se lê: "...Não há riscos em participar dessa pesquisa, pois as coletas já foram realizadas, não causaram dor ou desconforto e não foram invasivas..."

**Recomendações:**

As recomendações foram atendidas . Todavia sugere-se sugere-se uma reformulação na primeira pagina, segundo paragrafo, onde se lê: "...no início da vida através do início da vida e pode trazer como benefícios para a conscientização e reafirmar a importância da amamentação nos primeiros meses de vida..." e no final do terceiro paragrafo onde se lê: "...Não há riscos em participar dessa pesquisa, pois as coletas já foram realizadas, não causaram dor ou desconforto e não foram invasivas..."

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Adequar redação do TCLE conforme sugerido.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em 08/05/2014 a plenária votou de acordo com o relator.

<b>Endereço:</b> Av.Nene Sabino, 1801	
<b>Bairro:</b> Universitário	<b>CEP:</b> 38.055-500
<b>UF:</b> MG	<b>Município:</b> UBERABA
<b>Telefone:</b> (34)3319-8811	<b>Fax:</b> (34)3314-8910 <b>E-mail:</b> cep@uniube.br

UNIVERSIDADE DE UBERABA -   
UNIUBE

Continuação do Parecer: 640.974

UBERABA, 08 de Maio de 2014

---

**Assinador por:**  
**Geraldo Thedei Junior**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801  
**Bairro:** Universitário **CEP:** 38.055-500  
**UF:** MG **Município:** UBERABA  
**Telefone:** (34)3319-8811 **Fax:** (34)3314-8910 **E-mail:** cep@uniube.br