

# ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI – Streptococcus mutans NA CÁRIE DENTÁRIA

Naiara TIRADENTES\*

Fujiko Yamasiro KRETCHTOFF\*\*

Mariela Vieira Pereira LEÃO\*\*\*

Camelinda Schmidt UNTERKIRCHER\*\*\*\*

- RESUMO: Neste trabalho, usando ELISA e DOT-BLOT os autores analisaram os níveis séricos e salivares de IgG e IgA para antígenos solúveis e de superfície de Streptococcus mutans. Três grupos de indivíduos foram analisados: a) sem lesão de cárie (n = 10), b) com lesão de cárie (n = 10) e c) com cárie tratada (n = 9). Indivíduos sem lesão de cárie apresentavam títulos mais altos de IgA na saliva para antígenos solúveis de S. mutans. Anticorpos para antígenos de superfície foram detectados pelo DOT-BLOT na fração IgG sérica e, seus níveis eram mais elevados nos indivíduos com lesão de cárie.
- PALAVRAS-CHAVE: DOT-BLOT; ELISA; Streptococcus mutans; anticorpos.

## Introdução

\* Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

\*\* Estagiária – Departamento de Biopatologia e Diagnóstico – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

\*\*\* Aluna de Pós-Graduação – Mestrado – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

\*\*\*\* Departamento de Biopatologia e Diagnóstico – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

Diferentes espécies de estreptococos estão implicadas na etiologia da cárie dentária.<sup>10, 17</sup> Entre essas espécies destacam-se, pela sua frequência de isolamento, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*, encontrados em indivíduos com alta atividade de cárie.<sup>4,17</sup>

A imunização de animais de laboratório com células e/ou antígenos purificados de *S. mutans* induz anticorpos protetores contra a cárie dentária.<sup>8, 9, 11, 15</sup> Esses anticorpos interferem com o fenômeno de aderência do microrganismo à superfície do dente e reagem principalmente com antígenos de superfície, como o antígeno I/II (Ag I/II), também denominado antígeno B ou SpaA.<sup>6, 7, 9, 13</sup> O achado de anticorpos protetores em animais imunizados por *S. mutans* sugeriu a viabilidade de uma vacina anticárie e estimulou pesquisas nesse sentido.<sup>8, 10</sup> Entretanto, o interesse pela imunização ativa declinou rapidamente desde que Van de Rijn et al.<sup>16</sup> demonstraram que soros de coelhos hiperimunizados com essa bactéria apresentavam reatividade cruzada com tecido cardíaco. Desde então muito se tem estudado com o objetivo de afastar a suspeita. Dados reunidos até o momento mostram que a resposta antimiocárdio, observada em coelhos hiperimunizados, não está relacionada com AgI/II, mas pode ser devida a outro componente de superfície, provavelmente da membrana ou parede celular.<sup>1, 12, 19</sup>

Na clínica de doenças infecciosas, os estreptococos bucais estão freqüentemente associados a quadros de endocardite bacteriana subaguda. Nestes casos, pode-se detectar uma forte resposta de IgG e IgA para o Ag I/II e Ag III de *S. mutans*, enquanto os anticorpos anticoração estão ausentes.<sup>14</sup>

Com o objetivo de conhecer melhor a resposta imune humoral em indivíduos atingidos ou não pela cárie dentária, e como parte de uma investigação mais ampla sobre mimetismo antigênico entre *S. mutans* e coração, analisamos os níveis séricos e salivares de IgG e IgA para antígenos solúveis e de superfície desse microrganismo.

## Materiais e métodos

### População estudada

Foram estudados três grupos de indivíduos: a) com experiência prévia de cárie (cárie tratada – CT, n = 10) e CPOD médio de 7,6. A média de idade do grupo era de 21,2 anos; b) sem lesão de cárie (SLC, n = 10) composto por sete homens e três mulheres, cuja média de idade era 17,8

anos; c) com lesões ativas de cárie (CLC, n = 9). O grupo CLC tinha um CPOD médio de 8,88 e era constituído por 1 homem e 8 mulheres, com idade média de 22 anos.

Todos os indivíduos concordaram em participar do trabalho e deram seu consentimento por escrito, após terem sido esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e como seria utilizado suas amostras de sangue e saliva. Todos os documentos foram apresentados e aprovados pela comissão de ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

As amostras de sangue foram colhidas sem anticoagulante e os soros separados e analisados individualmente.

#### Amostras de salivas

De cada indivíduo foi coletado, num cálice graduado, 5 ml de saliva, acrescentando-se imediatamente azida sódica 0,002% e fluoreto de fenilmetilsulfonil (P7626-SIGMA) 5 mM. Em seguida, as salivas foram centrifugadas a 7.000 rpm, por 20 minutos (min) a 4°C, para remover restos celulares e substâncias sólidas presentes. As amostras do grupo CT foram reunidas num pool, precipitado com sulfato de amônio 50% e dialisado por 18 horas (h) contra solução salina tamponada com fosfato (PBS). As imunoglobulinas precipitadas foram então analisadas por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e DOT BLOT ante *S. mutans*.

#### Preparação do antígeno de *S. mutans*

*S. mutans*, cepa CCT 1910 (ATCC 35668), foi cultivado em 2.000 ml de caldo triptico de soja (DIFCO), distribuídos em três frascos e incubados a 37°C, por 24 h, em microaerofilia. Após este período, o crescimento foi interrompido com formaldeído 0,075% e a cultura deixada por 18 h a 4°C. A seguir, as células foram colhidas por centrifugação, lavadas três vezes em Tris - HCl 125 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5, ressuspensas em 50 ml do mesmo tampão e agitadas vigorosamente com pérolas de vidro, por 18 h a 4°C. O lisado foi então centrifugado a 15.000 rpm, por 30 min a 4°C e o sobrenadante e precipitado conservados. O sobrenadante, após diálise e concentração, passou a constituir o antígeno solúvel (AgSo). O precipi-

tado, lavado três vezes com Tris 125 mM, pH 7,5, foi extraído com Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, uréia 6 M e Tween 20 0,5%, por 5 min a 100°C e por 24 h a 4°C. O extrato obtido, após diálise e concentração, passou a ser designado antígeno de superfície (AgSu). A concentração de proteína nas preparações foi determinada pelo método de Bradford<sup>3</sup>, utilizando como padrão soro albumina bovina.

## ELISA

Placas de polistireno, com 96 orifícios (COSTAR) foram sensibilizadas com AgSo de *S. mutans* (100 µg/ml), em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. As placas foram incubadas por 1h 30 min a 37°C e a 4°C até o uso.

Antes de usar, as placas foram lavadas com PBS e os sítios livres bloqueados com 0,5% de gelatina (G) em PBS, por 30 min a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS, contendo 0,01% de Tween 20 (PBS-T) e os soros adicionados e diluídos na razão 2 em PBS-T-G. As placas foram então incubadas a 37°C por 1 h 30 min. A seguir, acrescentou-se o conjugado anti-IgA ou anti-IgG humana (2 µg/ml), marcado com peroxidase. A concentração do conjugado foi determinada previamente por titulação em bloco, utilizando-se três soros com diferentes reatividades para o antígeno em estudo.

A atividade de peroxidase foi evidenciada com o substrato ortofenilenodiamino (OPD) 6 mg em 12 ml de tampão citrato-ácido cítrico, 0,1 M, pH 5,5 e 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%. A reação desenvolveu-se por 30 min a 37°C e as densidades ópticas (DO) foram lidas num leitor ELISA (BIO RAD 3550). Na análise dos soros e salivas, considerou-se como ponto final da reação (título) a diluição com DO igual ou inferior a 0,050 a 490 nm.

## DOT-BLOT

Cerca de 5 mg do AgSu foram solubilizados em 100 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS 20%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,0005% e β mercaptoetanol 5%). Após completa dissolução do antígeno, depositaram-se 2 µl da preparação por ponto, na nitrocelulose. Em seguida, os sítios livres da nitrocelulose foram bloqueados com PBS-T acrescido de leite desnatado a 5% (PBS-T-L) por 1 h. Terminado

este período, os soros foram diluídos em PBS-T-L, colocados sobre as fitas e incubados por 2 h, à temperatura ambiente com agitação.

Após mais uma etapa de lavagem, acrescentou-se o conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (2 µg/ml) em PBS-T-L e incubou-se por 1 h 30 min. Finalmente, o complexo antígeno-anticorpo foi revelado com 5 mg de diaminobenzidina (DAB) em 20 ml de Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,6, 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%.

### Análise estatística

A análise estatística foi efetuada para os resultados das dosagens de anticorpos. Foram utilizados a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, o teste de Mann-Whitney e o teste por comparação múltipla de Dunn.

### Resultados

Na Figura 1, pode-se observar que os níveis de IgG sérica para AgSo de *S. mutans* não diferem nos três grupos estudados (Tabela 1). Já a resposta de IgA sérica era, aparentemente, mais elevada nos grupos CT e SLC, quando comparada com o grupo CLC, embora o valor de p também não fosse significante (Figura 2, Tabela 2).

Analisando as amostras de saliva, encontramos níveis mais altos de IgA para AgSo de *S. mutans* em indivíduos do grupo SLC. Jovens com lesões de cárie ativa tinham menos anticorpos dessa classe. A análise estatística mostrou que o valor de p estava bem próximo da significância (p = 0,052) e que valores inferiores a 0,05 poderiam ser alcançados testando-se maior número de amostras (Figura 3, Tabela 3). O pool de salivas do grupo CT também foi analisado, mas apresentava baixa reatividade.

Na Figura 4, apresentamos os resultados de IgG sérica para AgSu de *S. mutans*, usando a técnica do DOT-BLOT. As medianas obtidas para os três grupos foram SLC = 768, CT = 256 e CLC = 1.024 indicando uma clara distinção entre esses indivíduos. Isso se confirma pelo valor de p = 0,0134 (Tabela 4).

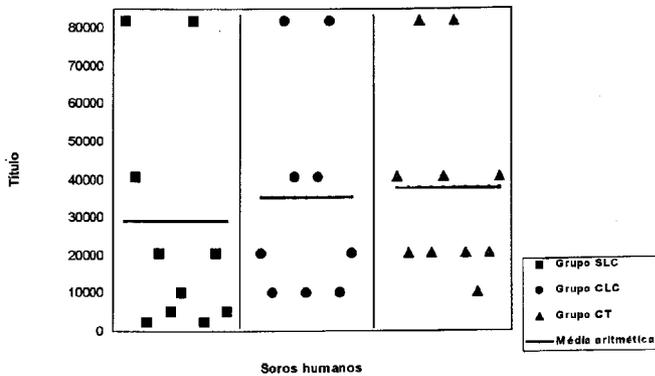


FIGURA 1 – Reatividade de IgG sérica para antígenos solúveis de *S. mutans*. Conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase.

Tabela 1 – Estatística descritiva e inferencial (teste Kruskal-Wallis) dos títulos de IgG sérica em ELISA, para os antígenos solúveis de *S. mutans*, segundo os grupos: SLC (sem lesão de cárie), CLC (com lesão de cárie) e CT (cárie tratado)

Grupos	Mínimo	Máximo	Mediana	Média dos postos
SLC	2.560	81.920	15.360	11,75
CLC	10.240	81.920	20.480	15,77
CT	10.240	81.920	30.720	17,55

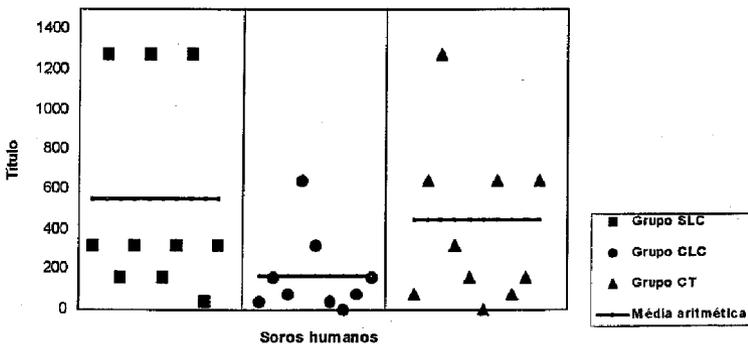


FIGURA 2 – Reatividade de IgA sérica para antígenos solúveis de *S. mutans*. Conjugado

estatística Kruskal-Wallis = 2,539; p = 0,281

Tabela 2 – Estatística descritiva e inferencial (teste Kruskal-Wallis) dos títulos de IgA sérica em ELISA, para os antígenos solúveis de *S. mutans*, segundo os grupos: SLC (sem lesão de cárie), CLC (com lesão de cárie) e CT (cárie tratada)

Grupos	Mínimo	Máximo	Mediana	Média dos postos
SLC	40	1.280	320	16,550
CLC	40	640	120	9,250

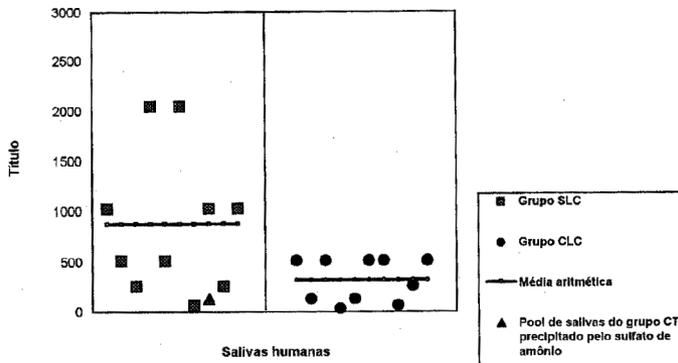


FIGURA 3 – Reactividade de IgA salivar para antígenos solúveis de *S. mutans*. Conjugado anti-IgA humana marcado com peroxidase.

CT	80	1.280	320	15,389
----	----	-------	-----	--------

estatística Kruskal-Wallis = 4,310; p = 0,1159

Tabela 3 – Estatística descritiva e inferencial (teste Mann-Whitney) dos títulos de IgA salivar em ELISA, para os antígenos solúveis de *S. mutans*, segundo os grupos: SLC (sem lesão de cárie), CLC (com lesão de cárie)

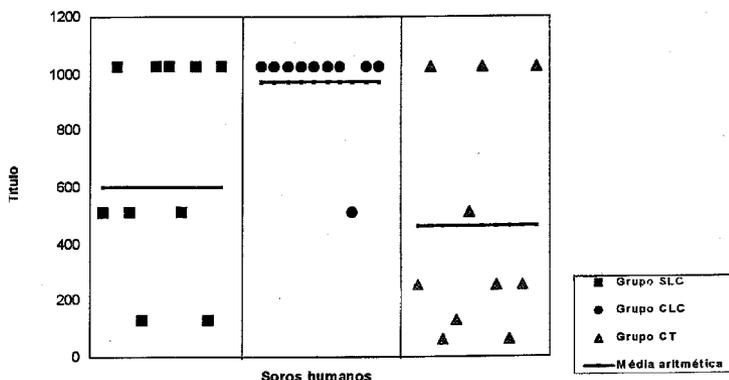


FIGURA 4 – Reatividade de IgG sérica para antígenos de superfície de *S. mutans*. Conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase.

Grupos	Mínimo	Máximo	Mediana	Média
SLC	64	2.048	768	876,8
CLC	32	512	384	316,8

estatística Mann-Whitney = 24,5;  $p = 0,0524$

Tabela 4 – Estatística descritiva e inferencial (teste Kruskal-Wallis) dos títulos de IgG sérica no DOT BLOT, para os antígenos de superfície de *S. mutans*, segundo os grupos: SLC (sem lesão de cárie), CLC (com lesão de cárie) e CT (cárie tratada)

Grupos	Mínimo	Máximo	Mediana	Média dos postos
SLC	128	1.024	768	15,1
CLC*	512	1.024	1.024	20,9
CT*	64	1.024	256	10,5

estatística Kruskal-Wallis = 8,632;  $p = 0,0134$

\* diferem ao nível de 5%, segundo teste de comparação múltipla de Dunn

## Discussão

Neste trabalho, altos títulos de anticorpos da classe IgG (81.920) para AgSo foram observados em indivíduos com e sem experiência prévia de cárie, indicando que estes anticorpos não estão envolvidos com proteção. Esse achado está de acordo com outros relatos, mostrando que a imunização intranasal de humanos com lipossomos contendo antígenos de *S. mutans* eleva os níveis de IgM e IgA séricos antiglicosiltransferase, mas não altera os níveis de IgG. Variação considerável foi observada entre indivíduos nos níveis pré-ímmunes desses anticorpos e, subseqüentemente, na resposta imune antiglicosiltransferase<sup>5</sup>

Nossos resultados demonstram que a experiência prévia de cárie não altera significativamente a resposta de IgG sérica para AgSo de *S. mutans*. O nível elevado de anticorpos, observado neste estudo, não parece estar correlacionado ao processo de cárie dentária. É bem provável que esses anticorpos sejam induzidos por diferentes antígenos de bactérias Gram positivas com reatividade cruzada com *S. mutans*.

Antes de discutirmos os resultados de IgA salivar, lembramos que a saliva é constituída basicamente por água e que as proteínas constituem 0,1 a 0,2% de seu peso total, sendo apenas uma pequena parte IgA. Assim, nos testes utilizando amostras de saliva, as diluições não podem ser altas, com o risco de perder em sensibilidade.<sup>4</sup>

Na população estudada, observamos níveis mais altos de IgA salivar para AgSo, em indivíduos resistentes à cárie, enquanto aqueles indivíduos com lesões de cárie ativa apresentavam níveis mais baixos dessas imunoglobulinas. Numa tentativa de equacionar melhor o problema, purificamos IgA do soro de indivíduos com e sem cárie. IgA de indivíduos ímmunes à cárie evidenciou duas a três bandas no Western-blotting, enquanto a reatividade de IgA sérica de pacientes com cárie era muito menos intensa, nas mesmas concentrações (dados não mostrados).

Achado semelhante foi relatado por Blanchard et al.<sup>2</sup> nas periodontites, onde níveis mais baixos de IgA secretora para *Porphyromonas gingivalis* foram encontrados em pacientes com a doença.

Com o objetivo de conhecer melhor a resposta imune mucosal, Winderström et al.<sup>18</sup> utilizaram a técnica de Western-Blotting e ELISA para analisar a resposta de IgA salivar ante cepas de referência ou recentemente isoladas de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Padrões muito similares de reatividade foram vistos para IgA salivar e *S. mutans*. Amostras de saliva coletadas de um mesmo indivíduo em vários dias consecutivos apresentaram níveis de reatividade muito próximos, tanto para isolados frescos quanto para aqueles de cultura de estoque.

Bratthall et al.<sup>4</sup> também estudaram a importância da experiência de cárie nos níveis de IgA salivar específica, em crianças tailandesas. Foram analisadas amostras de saliva total coletadas após estimulação com parafina. Os resultados desse trabalho mostraram que salivas de crianças com baixa prevalência de cárie reagem com mais polipeptídeos distintos no western-blotting que salivas de crianças com alta prevalência da doença, sugerindo uma relação entre IgA salivar e proteção. O western-blotting de crianças tailandesas também evidenciou menos bandas quando comparado com o de crianças suecas imunes à cárie e da mesma faixa etária.

Esses dados estão de acordo com os nossos resultados e também com aqueles de Gregory et al.<sup>7</sup>, que sugeriram um papel para esses anticorpos na neutralização de fatores de virulência do microrganismo, tais como glicosiltransferase e glicosefosfotransferase.

Surpreendeu-nos o achado no DOT-BLOT de uma diferença estatisticamente significativa nos títulos de IgG sérica para AgSu de *S. mutans* nos indivíduos com lesões ativas de cárie. Achado sugestivo de uma resposta secundária para esses antígenos e que deve incluir anticorpos de outras classes, como IgA. Infelizmente, não foi possível avaliar os níveis séricos ou salivares de IgA para antígenos de superfície no DOT-BLOT, em razão de suas baixas concentrações.

## Conclusão

Nossos resultados sugerem que os níveis de IgA salivar para AgSo de *S. mutans* podem estar relacionados com resistência à cárie dentária em indivíduos adultos, mas que a resposta de IgG sérica para AgSu é um indicador mais sensível quando se pretende avaliar resposta imune humoral ante *S. mutans*.

Indivíduos adultos, sem experiência de cárie, apresentavam níveis mais altos de IgA salivar para AgSo em ELISA. Quanto ao AgSu o DOT-BLOT foi o método mais adequado para analisar a resposta de IgG sérica.

TIRADENTES, N., KRECHTOFF, F. Y., LEÃO, M. V. P., UNTERKIRCHER, C. S. Streptococcus Mutans especific antibodies in dental carie. Rev. Odontol. UNESP (São Paulo), v.28, n.2, p.273-284, 1999.

- **ABSTRACT:** In this paper, using ELISA and dot-blotting assay, IgG and IgA antibody levels present in serum and in saliva samples were compared for soluble and surface antigens from Streptococcus mutans. Three groups of subjects were considered: caries-free individuals, caries active and caries-treated patients. Caries-free subjects exhibited higher titers of IgA against soluble proteins than the other groups. Antibodies to surface antigens may only be determined by dot-blotting in IgG isotype and their titers were more elevated in sera of patients suffering with caries.
- **KEYWORDS:** DOT-BLOT; ELISA; Streptococcus mutans; antibodies.

## Referências bibliográficas

- 1 AYAKAWA, G. Y. et al. Immunochemistry of the Streptococcus mutans BHT cell membrane: detection of determinants cross reactive with human heart tissue. Infect. Immun., v.48, p.280-6, 1985.
- 2 BLANCHARD, S. B., COX, S. E., EBERSOLE, J. L. Salivary IgA responses to Porphyromonas gingivalis in the cynomolgus monkey. I. Total IgA and IgA antibody levels to P. gingivalis. Oral Microbiol. Immunol., v.6, p.341-9, 1991.
- 3 BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., v.72, p.248-54, 1976.
- 4 BRATTHALL, D. et al. Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans Streptococci. Oral Microbiol. Immunol., v.12, p.212-8, 1997.
- 5 CHILDERS, N. K., TONG, G., MICHALEK, S. M. Nasal immunization of humans with dehydrated liposomes containing Streptococcus mutans antigen. Oral Microbiol. Immunol., v.12, p.329-35, 1997.
- 6 DOUGLAS, C. W. L., RUSSEL, R. R. B. Effects of specific antisera upon Streptococcus mutans adherence to saliva-coated hydroxyapatite. FEMS Microbiol. Lett., v.25, p.211, 1984.
- 7 GREGORY, R. L. et al. Function of anti-Streptococcus mutans antibodies: inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. Oral Microbiol. Immunol., v.5, p.181-8, 1990.
- 8 KRASSE, B., EMILSON, C. G., GAHNBERG, L. An anticaries vaccine: report on the status of research. Caries Res., v.21, p.255-78, 1987.

- 9 LEHNER, T. et al. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkey. *Infect. Immun.*, v.34, p.407-15, 1981.
- 10 MCGHEE, J. R., MICHALEK, M. S. Immunobiology of dental caries: microbial aspects and local immunity. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.35, p.595-638, 1981.
- 11 MICHALEK, S. M., CHILDERS, N. K. Development and outlook for a caries vaccine. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.1, p.37-54, 1990.
- 12 RUSSEL, M. W. Analysis of heart-reactive antibodies induced in rabbits by immunization with *Streptococcus mutans*. *J. Oral Pathol.*, v.16, p.234-40, 1987.
- 13 \_\_\_\_\_. Interaction between surface protein antigens of *Streptococcus mutans* and human salivary components. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.4, p.106-11, 1989.
- 14 RUSSEL, M. W. et al. Serum antibody responses to *Streptococcus mutans* antigens in humans systemically infected with oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.7, p.321-5, 1992.
- 15 RUSSEL, R. R. B., BEIGHTON, D., COHEN, B. Immunisation of monkeys (*Macaca fascicularis*) with antigens purified from *Streptococcus mutans*. *Br. Dent. J.*, v.81, p.81-4, 1982.
- 16 VAN DE RIJN, L., BLEIWEIS, A. S., ZABRISKIE, J. B. Antigen in *Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. *J. Dent. Res.*, v.55, p.59-64, 1976.
- 17 VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, v.73, p.672-81, 1994.
- 18 WINDERSTRÖM, L., BRATTHALL, D., HAMBERG, K. Immunoglobulin A antibodies to mutans streptococci in human saliva and serum comparing fresh and subcultivated strains and activity in repeated saliva samples. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.9, p.278-83, 1994.
- 19 WU, H., RUSSEL, M. W. Immunological cross-reactivity between *Streptococcus mutans* and human heart tissue examined by cross-immunization experiments. *Infect. Immun.*, v.58, p.3545-52, 1990.