

# Anticorpos reativos com *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes* na saliva de crianças com e sem cárie

## ANTIBODIES AGAINST *STREPTOCOCCUS MUTANS* AND *STREPTOCOCCUS PYOGENES* IN SALIVA OF CHILDREN WITH AND WITHOUT CARIES

Ana Lucia Almeida Fukuda  
Departamento de Biologia da Universidade de Taubaté  
Célia Regina Gonçalves  
Antônio Olavo Cardoso Jorge  
Mariella Vieira Pereira Leão  
Instituto Básico de Biociências, Universidade de Taubaté

### RESUMO

*Streptococcus mutans* é a principal espécie cariogênica que coloniza a superfície dos dentes. Estudos sobre reatividade cruzada sugerem a existência de semelhança antigênica entre *S. mutans*, tecido cardíaco e *Streptococcus pyogenes*, principal causa de faringite em crianças. Neste trabalho, analisaram-se os níveis salivares de IgA anti-*S. mutans*, anti-*S. pyogenes* e anti-miosina em 30 crianças com cárie ativa e 30 crianças sem cárie, atendidas na Clínica de Odontopediatria da Universidade de Taubaté e da Escola Judithe Weber do município do Potim. Coletaram-se 2 mL da saliva de cada criança e os níveis salivares de IgA foram analisados pela técnica de ELISA. Observou-se que as médias das densidades ópticas das salivas do grupo com cárie eram mais elevadas, significando níveis maiores de IgA para todos os antígenos testados, inclusive antígenos irrelevantes. Esses resultados sugerem uma estimulação policlonal na cavidade bucal das crianças com maior estimulação antigênica e confirmam os resultados conflitantes a respeito do papel dos anticorpos na proteção contra cárie.

### PALAVRAS-CHAVE

*Streptococcus mutans*. *Streptococcus pyogenes*. Miosina. IgA.

### INTRODUÇÃO

*Streptococcus mutans* é a principal espécie cariogênica que coloniza a superfície dos dentes (JORGE, 1995). A imunização com antígenos purificados deste microrganismo induz proteção contra cárie dentária em diferentes modelos animais (MICHALEK ;

CHILDERS,1990). Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina anticárie tem sido dificultado desde o encontro de reatividade cruzada entre *S. mutans* e tecido cardíaco humano (VAN DE RIJN; BLEIWEIS; ZABRISKIE, 1976).

Ayakawa et al. (1988) observaram que os antígenos de *S. mutans* de reatividade cruzada com tecido cardíaco também compartilhavam epítopos com *Streptococcus pyogenes*. Anticorpo monoclonal anti-*S. pyogenes*, utilizado pelos autores, reagia com proteínas de extratos de células de *S. mutans* e *S. rattus*, de peso molecular similares a de *S. pyogenes*. Krisher e Cunningham (1985) verificaram que anticorpos monoclonais reativos com membranas de *S. pyogenes* reagiam com componentes do coração, mais especificamente miosina cardíaca, e também com componentes de *S. mutans*.

*S. pyogenes* é a causa mais comum de faringite bacteriana, principalmente em crianças. Estas infecções orofaríngeas podem levar ao desenvolvimento de febre reumática, doença inflamatória que pode levar ao desenvolvimento de cardite, podendo progredir gradualmente para cardiopatias reumáticas crônicas (MURRAY, 2000). Soros de pacientes com febre reumática contêm anticorpos contra antígenos de *S. pyogenes*.

Anticorpos para muitos microrganismos, incluindo *S. mutans*, estão naturalmente presentes na cavidade oral. Vários estudos têm associado níveis de anticorpos reativos com *S. mutans* em vários fluidos biológicos (soro, saliva, fluido gengival, por exemplo) com níveis de microrganismos na cavidade bucal ou atividade de cárie (AALTONEN et al., 1985; AKIYOSHI et al., 1998; BOLTON; HLAVA, 1982). No entanto, os resultados são bastante conflitantes. Na literatura não são encontrados relatos sobre correlação em humanos de *S. mutans*

e *S. pyogenes*, nem da resposta imunológica para ambos.

Como os trabalhos sobre reatividade cruzada apontam para existência de epitopos compartilhados por *S. mutans*, *S. pyogenes* e tecido cardíaco, neste trabalho procuramos analisar os níveis salivares de IgA anti-*Streptococcus mutans*, anti-*Streptococcus pyogenes* e anti-miosina em crianças com cárie ativa e crianças sem cárie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Grupo estudado

Foram selecionadas 30 crianças com cárie ativa e 30 crianças sem cárie, com idades entre 4 e 10 anos, atendidas na Clínica de Odontopediatria da Universidade de Taubaté e na Escola Judite Weber, no município de Potim. O diagnóstico de cárie foi confirmado pelos profissionais responsáveis pelo atendimento.

Os responsáveis pelos pacientes foram informados dos objetivos e dos procedimentos da pesquisa e as amostras foram coletadas somente após o consentimento livre e esclarecido deles. Os responsáveis também foram informados que a não concordância em participar da pesquisa não afetaria o atendimento odontológico. O projeto e a metodologia da pesquisa foram aceitos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté.

### Coleta das amostras

Foram coletados 2mL de saliva de cada paciente, sem estimulação prévia, em coletores descartáveis. Logo após a coleta foram acrescentados à amostra inibidores de proteases e conservantes. As amostras foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### Obtenção dos antígenos de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* (antígenos irrelevantes) e miosina

*Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* foram isolados da cavidade oral de indivíduos saudáveis e identificados no laboratório de Microbiologia da Universidade de Taubaté. *Streptococcus pyogenes*, isolados da orofaringe de indivíduos saudáveis, também foram identificados no laboratório de Microbiologia da Universidade de Taubaté. Os microrganismos foram cultivados, separadamente, em *Brain Heart Infusion* (BHI- Difco). O crescimento microbiano foi interrompido com formaldeído 0,075% e a cultura, deixada por 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A seguir, as células foram colhidas por centrifugação e lavadas três vezes em solução salina. Em seguida, as células foram suspensas em 5 mL de

salina com formaldeído 0,025% e conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A miosina cardíaca purificada foi doada pela Professora Doutora Carmelinda Schmidt Unterkircher, da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos.

### ELISA

Placas de poliestireno com 96 orifícios foram sensibilizadas com antígenos de *S. mutans*, *S. pyogenes*, *E. coli* e miosina em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. As suspensões de *S. mutans*, *S. pyogenes* e *E. coli* utilizadas para sensibilização continham aproximadamente  $10^9$  células/mL. A miosina foi utilizada na concentração 5  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e mantidas em geladeira até o momento do uso. As placas foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e os sítios livres do poliestireno bloqueados com 0,5% de gelatina (PBS-G) por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,1% de Tween-20 (PBS-T). As amostras de saliva foram, então, diluídas a 1/10 e 1/20 em PBS-T-G e adicionadas aos orifícios da placa. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas, lavadas com PBS-T e, posteriormente, foi adicionada aos orifícios anti-IgA marcada com peroxidase. Depois da lavagem com PBS-T, a atividade da peroxidase foi revelada utilizando-se o substrato ortofenilenodiamino (OPD-Sigma): 6mg em 12 mL de tampão citrato-ácido cítrico 0,1M, pH 5,5 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30%. A reação foi desenvolvida por 5 minutos à temperatura ambiente, e, imediatamente bloqueada com ácido sulfúrico 2,5N. As densidades ópticas (D.O.) foram lidas em leitor de ELISA (VersaMax) no comprimento de onda de 490 nm.

### Análise estatística

Os valores de D.O. obtidos do grupo com cárie foram comparados com os valores de D.O. do grupo sem cárie, utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de p menores que 0,05.

## RESULTADOS

Análise dos anticorpos da classe IgA.

Observou-se que as médias dos valores de D.O. dos dois grupos estudados apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), em todas as diluições testadas. O grupo com cárie apresentou níveis maiores de IgA salivar anti-*S. mutans* (Figura 1), anti-*S. pyogenes* (Figura 2), anti-miosina e anti-*Escherichia coli* (Tabela 1), quando comparados com os níveis observados no grupo sem cárie.

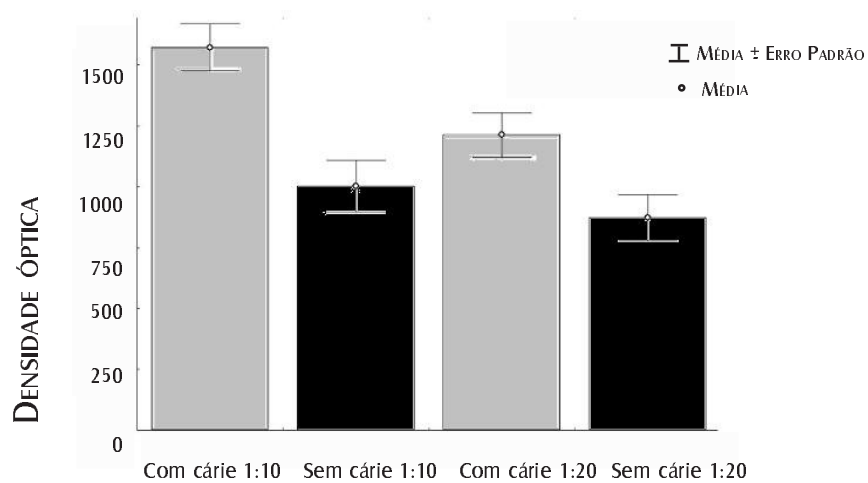


Figura 1. Comparação das densidades ópticas (D.O.) referentes aos níveis de IgA anti- *S. mutans* entre os grupos com cárie e sem cárie nas diluições 1:10 e 1:20

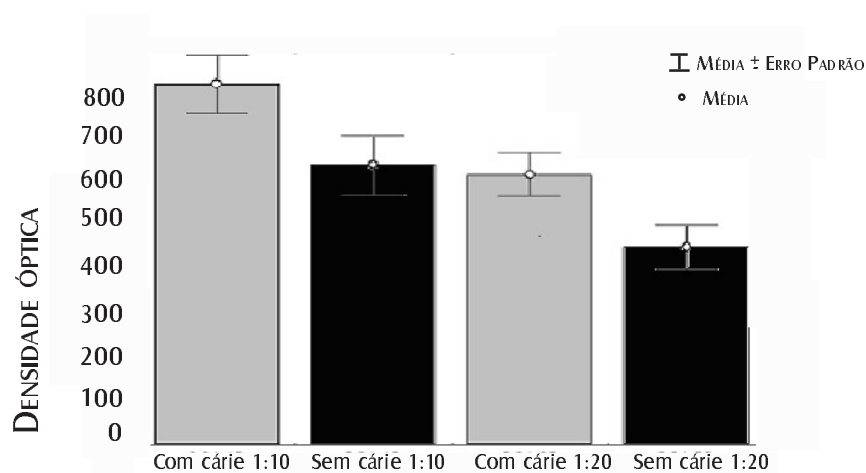


Figura 2. Comparação das densidades ópticas (D.O.) referentes aos níveis de IgA anti- *S. pyogenes* entre os grupos com cárie e sem cárie nas diluições 1:10 e 1:20.

Tabela 1. Médias das densidades ópticas dos grupos com cárie (CC) e sem cárie (SC) para miosina e antígenos de *E. coli* nas diluições 1:10 e 1:20.

Grupos	Com Cárie 1:10	Sem Cárie 1:10	Com Cárie 1:20	Sem Cárie 1:20
Miosina	0,479	0,315	0,314	0,264
<i>E. coli</i>	0,335	0,244	0,255	0,172

\* Análise estatística da comparação entre CC 1:10 e SC1:10, e CC1:20 e SC1:20: valores de  $p < 0,05$

Os níveis de IgA reativos com antígenos de *S. mutans* foram maiores que os níveis de IgA para os demais antígenos estudados (dados não mostrados).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A função protetora das imunoglobulinas já é bastante conhecida (MICHALEK; CHILDERS, 1990). Os anticorpos se unem a qualquer substância invasora neutralizando-a e impedindo sua adesão aos tecidos. Nas mucosas esta função é exercida principalmente pelas IgA secretoras (ROITT; BROSTOFF; MALF, 2003). A IgA secretora tem várias funções, tais como aglutinação, precipitação, opsonização, supressão da inflamação, inibição da colonização e da penetração de antígenos e neutralização de toxinas, vírus e enzimas (MESTECKY et al., 1986).

A defesa imune específica contra *Streptococcus mutans* é realizada pelos anticorpos IgA salivares produzidos na mucosa da cavidade bucal (RUSSELL et al., 1999). A IgA liga-se às bactérias impedindo a sua colonização na superfície dos dentes e facilitando a sua eliminação (RUSSELL et al. 2004).

Vários trabalhos têm procurado relacionar níveis de IgA anti-*S. mutans* e resistência ou susceptibilidade à cárie. Neste trabalho analisaram-se os níveis de anticorpos salivares de crianças com cárie e crianças sem cárie, e observou-se que o grupo com cárie apresentou maiores níveis de IgA para antígenos de *S. mutans*.

Akiyoshi et al. (1998), comparando grupos de crianças com índices de CPODs iguais ou maiores que zero, não verificaram diferença significativa nas concentrações médias de IgA, embora houvesse uma tendência do grupo com cárie apresentar concentrações mais elevadas. Também Yazaki et al. (1999) não encontraram diferenças importantes nos níveis de IgA anti-*S. mutans* entre crianças com e sem cárie.

Bolton e Hlava (1982) observaram no grupo de crianças sem cárie uma maior quantidade de IgA anti-*S. mutans*. A atividade de cárie estava associada com altos níveis de IgA salivar para glucano e ácido teicóico e baixos níveis de anticorpos para células totais. Os autores sugeriram um papel protetor para os anticorpos reativos com células inteiras de *S. mutans*. Aaltonen et al. (1985) e Gregory et al. (1990) também encontraram níveis maiores de IgA em indivíduos sem cárie.

De acordo com Tenovuo e Aaltonen (1991), não há uma conclusão definitiva se realmente anticorpos IgA

e IgG protegem contra a adesão de *S. mutans* e, conseqüentemente, contra o desenvolvimento da cárie. Em crianças, anticorpos séricos IgG anti-*S. mutans* parecem ser mais importantes do que IgA salivares. Em modelos animais a IgG sérica forneceu proteção efetiva contra *S. mutans*, embora em humanos seu papel não esteja ainda estabelecido.

Krasse, Emilson e Gahnberg (1987) discutiram o efeito da imunização com antígenos de *S. mutans* no desenvolvimento de cárie. Os autores relataram vários trabalhos que demonstram a redução de cárie em modelos animais, mas não chegaram a conclusão se em humanos os anticorpos seriam realmente eficazes.

Indivíduos com cárie geralmente apresentam mais estreptococos na cavidade da boca (YAZAKI et al., 1999). Os antígenos estreptocócicos podem estimular o sistema imunológico local e induzir a produção de grandes quantidades de IgA anti-*S. mutans*. Isto poderia explicar o encontro dos níveis elevados destes anticorpos no grupo com cárie estudado neste trabalho. Também, de acordo com Mosci e Marconi (1989), a restauração de lesões de cárie pode contribuir para o aumento dos níveis de anticorpos salivares. Várias crianças do grupo com cárie estudado apresentavam lesões cariosas tratadas, o que também pode ter contribuído para o aumento de anticorpos neste grupo.

Neste trabalho também analisamos os níveis de IgA anti-*S. pyogenes* e antimiosina nos grupos estudados. Observou-se que os níveis de IgA anti-*S. pyogenes* e antimiosina também estavam aumentados no grupo com cárie ativa, acompanhando os níveis de IgA anti-*S. mutans*. Estes resultados sugerem uma correlação entre estes microrganismos, o que já tem sido investigado por alguns autores. Van De Rijn, Bleiweis e Zabriskie (1976) imunizaram animais com antígenos de *S. mutans* e verificaram um aumento de anticorpos com reatividade para antígenos de *S. pyogenes*. Krisher e Cunningham (1985), estudando a reatividade de alguns anticorpos monoclonais reativos com *S. pyogenes* e miosina, verificaram que esta reatividade poderia ser reduzida adsorvendo os anticorpos com *S. mutans*. Okada et al. (1996), estudando a reatividade cruzada de antígenos estreptocócicos e tecido cardíaco, sugeriram que uma sensibilização inicial por *S. mutans* poderia modular respostas imunes para infecções subseqüentes de *S. pyogenes*.

Existe ainda a hipótese de os níveis maiores de anticorpos reativos com *S. pyogenes* e miosina do grupo com cárie serem conseqüência de uma estimulação

policlinal. O encontro de níveis elevados de IgA anti-*E. coli* neste grupo fortalecem esta hipótese. Portanto, os antígenos estreptocócicos poderiam estar estimulando vários clones de linfócitos B e introduzindo a produção de grandes quantidades de IgA inespecíficas.

Podemos concluir que não há um resultado definitivo sobre a função dos anticorpos anti-*S. mutans* na proteção contra cárie, já que há muitas controvérsias na literatura. Quanto à semelhança antigênica entre os microrganismos investigados, nossos resultados não puderam confirmar esta correlação, uma vez que os anticorpos aumentados da classe IgA no grupo com cárie foram reativos para todos os antígenos testados, sugerindo uma estimulação policlinal.

## ABSTRACT

*Streptococcus mutans* is the main cariogenic microorganism that colonizes teeth surface. Evidences have suggested that *Streptococcus mutans* contains antigens, which are immunologically cross-reactive with cardiac tissue and *Streptococcus pyogenes*, the etiologic agent of faryngitis. Levels of IgA anti-*S. mutans*, anti-*S. pyogenes* and anti-myosin were analyzed in saliva from 30 children with active caries and 30 children without caries, from Odontopediatric Clinic of Taubaté University and Judithe Weber Municipal School of Potim. Two milliliters of saliva from each child were collected and salivary levels of IgA were analyzed by ELISA. The results showed that means of salivary optic density from group with caries were increased, meaning elevated levels of IgA reactive with all tested antigens, including irrelevant antigens. These results suggest a polyclonal stimulation in oral cavity of children with more antigenic stimulation, and confirm the conflict in results about the role of antibodies in caries protection.

## KEY-WORDS

*Streptococcus mutans*. *Streptococcus pyogenes*. Myosin. IgA.

## REFERÊNCIAS

- AALTONEN, A.S. et al. Serum antibodies against oral *Streptococcus mutans* in young children in relation to dental caries and maternal close-contacts. *Archive Oral Biology*, Nova Iorque, v.30, n. 4, p. 331-335, 1985.
- AKIYOSHI, N. et al. Quantificação da IgA secretora e sua correlação com os níveis salivares de estreptococos *mutans* e lactobacilos em crianças de 7 e 8 anos de idade. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v.12, n. 2, p.129-136, 1998.
- AYAKAWA, G.Y. et al. Heart cross-reactive antigens of *mutans streptococci* share epitopes with group A streptococci and myosin. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v. 140, n. 1, p. 253-257, 1988.
- BOLTON, R.W.; HLAVA, G.L. Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children: correlation with dental caries activity. *Journal Dental Research*, Chicago, v. 61, n. 11, p. 1225-1228, 1982.
- GREGORY, R.L. et al. Function of anti- *Streptococcus mutans* antibodies inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. *Oral Microbiology Immunology*, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 181-188, 1990.
- JORGE, A.O.C. Microbiologia da cárie dentária. In \_\_\_\_\_. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Santos, 1995. p. 50-65.
- KRASSE, B.; EMILSON, C.G.; GAHNBERG, L. An anticaries vaccine: report on the status of research. *Caries Research*, Nova Iorque, v. 21, n. 3, p.255-276, 1987.
- KRISHER, K.; CUNNINGHAM, M.W. Myosin: a link between streptococci and heart. *Science*, Washington, v.227, n.4685, p. 413-415, 1985.
- MESTECKY, J. et al. The human IgA system: a reassessment. *Clinical Immunology Immunopathology*, Nova Iorque, v. 40, n. 1, p. 105-114, 1986.
- MICHALEK, S. M.; CHILDERS, N.K. Development and outlook for a caries vaccine. *Critical reviews in Oral Biology and Medicine*, Alexandria, v.1, n.1, p. 37-54, 1990.
- MOSCI, F ; MARCONI, P.F. Anticaries vaccination: present and future prospects. *Minerva Sintomatology*, Roma, v.38, n. 3, p.379-388, 1989.
- MURRAY, P.R. et al. Bacteriologia. In: \_\_\_\_\_. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.128-309.
- OKADA, K. et al. Possible role for a polysaccharide shared

between *Streptococcus pyogenes* and *S. mutans* in the pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis. *Acta Paediatric Japanese*, Tokushima, v.38, n. 5, p.470-475, 1996

ROITT, I.; BROSTOFF, J., MALE, D. Anticorpos. In: \_\_\_\_\_. *Imunologia*. 6.ed. Barueri, SP: Manole, 2003. p.65 -83.

RUSSELL, M.W. et al. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Research*, Birmingham, v.33, n.1, p.4-15, 1999.

RUSSELL, M.W. et al. A caries vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. *Caries Research*, Nova Iorque, v.38, n.3, p.230-235, 2004.

TENOYUO, J.; AALTONEN, A.S. Antibody responses to mutans streptococci in children. *Process Finnish Dental Society*, Turku, Finlândia, v.87, n.4, p. 449-461, 1991.

VAN DE RIJN, I.; BLEIWEIS, AS.; ZABRISKIE, J.B. Antigens in

*Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. *Journal Dental Research*, Washington, v.55, p. 59-64, 1976.

YAZAKI, S.C. et al. IgA anti- *Streptococcus mutans* em crianças com e sem cárie dentária. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v.13, n. 3, p. 211-217, 1999.

**Mariella Vieira Pereira Leão**

Professora Doutora de Microbiologia e Imunologia na Universidade de Taubaté  
Rua Machado Sidney n. 11 apto 91  
CEP 122445-650- centro. S.J.C  
e-mail: mariellaleao@yahoo.com.br

**TRAMITAÇÃO**

Artigo recebido em: 28/07/2005

Aceito para publicação em : 16/09/2005