

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

BRUNA ALVARENGA DIAS

**VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME CARIOGÊNICO EM
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

Juiz de Fora
2015

BRUNA ALVARENGA DIAS

**VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME CARIOGÊNICO EM
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração em Clínica Odontológica.

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Afonso Miranda Chaves
Coorientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva**

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Alvarenga Dias, Bruna.

Verificação da inibição da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme cariogênico em *Streptococcus mutans* / Bruna Alvarenga Dias. -- 2015.

91 p.

Orientadora: Maria das Graças Afonso Miranda Chaves

Coorientador: Frederico Pittella Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica, 2015.

1. Inibição de biofilme dentário. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Proteínas frutossiltransferase e glicosiltransferase. I. Afonso Miranda Chaves, Maria das Graças, orient. II. Pittella Silva, Frederico, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

OFEREÇO ESTE TRABALHO,

A nossa santíssima trindade, Pai, Filho e Divino Espírito Santo. E em comunhão com estas forças maiores que nos guiam conseguimos transpor obstáculos e seguirmos baseados no amor de Deus pai todo poderoso, que nos rege, guarda e ilumina. Obrigada meu pai por me fortalecer em momentos em que fraquejei e por me amar incondicionalmente!

AGRADEÇO,

Aos meus pais Acrísio e Celeste Aída, por serem os iniciadores deste caminho e grandes estimuladores da busca incessante pelo conhecimento e aprendizado constantes. Meus queridos pais, saibam que foram meus maiores exemplos de estudo contínuo e busca pelo saber. Tenho enorme estima e orgulho por advir de uma união de duas pessoas com extremas capacidade intelectual e sensibilidade interpessoal. A demonstração cotidiana do ato da leitura refletiu em mim a vontade de querer me aproximar dos gibis, revistas, livros,...e apreciá-los desde muito nova. Assistir discursos e palestras pronunciados de modo magnífico pela senhora, minha mãe, - acompanhar a forma séria e concisa com a qual o senhor, meu pai, regeu sua carreira foram grandes exemplos pelos quais sempre quis me espelhar. Acima de tudo, lhes agradeço por me transmitirem muito carinho, dedicação e amor, vocês são minha base, meu tudo! E nunca me esquecerei de seus ensinamentos, meus grandes mestres da vida! Muito obrigada por tudo! Amo muito vocês!!!

A meu marido Lincoln, por ser meu maior amigo e incentivador na iniciação e conclusão do Mestrado em Clínica Odontológica. Pela paciência em momentos de dúvidas, irritabilidade e ansiedade, e por nunca ter duvidado de minha capacidade, transmitindo-me muita força, amor, compreensão e carinho. Meu amor, gostaria que soubesse que caso o destino não nos unisse de forma tão inesperada e incomum a

realização deste sonho seria um projeto um tanto quanto longínquo. Saiba que você foi a peça fundamental para que este sonho se tornasse realidade e sua imensa ajuda foi e continua sendo essencial para que eu evolua cada dia mais e consiga superar todas as dificuldades e fragilidades. Encontrar uma outra pessoa que nos complete e que queira “seguir junto na mesma estrada” não é tarefa nada fácil. E quando isto acontece é a prova de que Deus ouviu nossas orações. O sentimento repentino e arrebatador que surgiu entre nós me fez crer que realmente conhecemos pessoas que tem a capacidade de nos transformar no melhor que podemos ser e você foi realmente capaz de promover esta transformação em meu ser. Deus te colocou em minha vida para que aprendesse muitos valores, pensamentos e ações de maneira sábia e objetiva. A cada dia que passo ao seu lado sinto-me mais mulher, mais madura e cada vez mais forte. Conhecer sua trajetória de vida me mostrou um verdadeiro exemplo de superação, garra, ousadia, otimismo e coragem. E ver em você um profissional comprometido, estudioso e competente faz de mim uma esposa orgulhosa e uma de suas maiores admiradoras. Daqui a alguns meses formaremos uma família um pouco maior e seremos certamente cada vez mais unidos e felizes. Tenho certeza que assim como é um excelente marido será um pai maravilhoso. Quero que não se esqueça de que estarei ao seu lado em momentos de luta, fraqueza ou de glória e fortaleza. Te amo muito e obrigada por tudo!!!

Ao meu filho, que certamente já torce por minha vitória, e já é uma grande fonte de paz e inspiração nestas últimas etapas. Francisco, saibas que foi um grande e um dos maiores incentivadores da finalização deste trabalho e deste Mestrado. Não foi nada fácil terminar o trabalho em meio a enjoos, gastrites, cansaço e alguns chutes na barriga. Entretanto, encontro-me cada dia mais motivada a crescer e evoluir, pensando sempre no bem estar de nossa família e em lhe transmitir os verdadeiros valores da vida que são resumidos em uma só palavra – AMOR. Você já está me fazendo enxergar tudo sob um novo ângulo, diante de uma perspectiva mais altruísta, e em um grande transbordamento das mais puras emoções e sensações. Saibas meu querido que já és aguardado com grande ansiedade e expectativa! Nós te amamos muito!!!

Aos meus irmãos Anderson, Ricardo e Daniel, por sempre me estimularem a seguir o caminho da docência e do saber. Por torcerem e comemorarem comigo minhas vitórias e até mesmo transmitirem palavras de força e otimismo para que nunca desistisse de lutar por meus sonhos e ideais. Cada um de vocês três foi de extrema importância para meu crescimento emocional, pessoal e profissional. Obrigada por acreditarem sempre em meu potencial e por serem meus grandes protetores! Amo muito vocês!!!

À minha “sogrinha-mãe” Heloísa Helena, pelo carinho e amor de mãe com os quais me acolheu e por sempre me transmitir palavras de apoio e incentivo ao longo desta

trajetória. Considero-me imensamente sortuda em ter lhe conhecido e por ser sua nora. Faltam-me palavras para descrever o quanto lhe admiro por esta personalidade marcante e inigualável de imensa bondade e detentora de um coração enorme e caridoso. Obrigada por sua ajuda e companheirismo constante em nossas vidas! Te amo!!!

Aos meus queridos padrinhos Wilson e Jacqueline, meus grandes professores, amigos, conselheiros... meu "paizinho querido" e minha "mãezinha querida", vocês são grandes exemplos de casal, profissionais e excelentes pais. Obrigada por sempre se preocuparem comigo e serem presença constante durante todas as etapas de minha vida. E apesar de alguns momentos nos distanciarmos fisicamente sei que a todo e qualquer momento posso contar com vocês. Muito obrigada por tudo! Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Prof.^a Maria das Graças Afonso Miranda Chaves, por ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho e por sempre compreender minhas inseguranças, dúvidas e falhas. Agradeço pelos conselhos transmitidos nos momentos oportunos, compreendendo sempre minhas limitações e me auxiliando na busca do conhecimento e pela conquista de meus ideais. Admiro muito seu otimismo e positividade em tudo que se propõe a fazer. E mesmo em meio a inúmeras atribulações cotidianas sempre demonstra ser uma pessoa forte, determinada e extremamente carismática. És um grande exemplo também de mulher, mãe e profissional. Obrigada pelo carinho maternal com o qual me acolheu, acreditando sempre em mim e em meu projeto. Muito obrigada mesmo Graça!!!

Ao meu coorientador, Prof. Frederico Pittella Silva, que pacientemente me acolheu e auxiliou nesta árdua caminhada, colaborando com inúmeros ensinamentos e com seu vasto conhecimento. Agradeço por sua grande colaboração e por demonstrar a beleza da ciência farmacológica de forma simples e bem-humorada. Muito obrigada Fred!!!

Ao Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Laboratório de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, por

disponibilizarem materiais e o espaço para a realização deste projeto. Agradeço aos alunos e professores pela gentileza e simpatia com a qual me receberam. Muito obrigada!

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS – FIOCRUZ) por disponibilizarem as cepas utilizadas no estudo. Aos profissionais desta instituição extremamente organizada, pela presteza e clareza de informações que me disponibilizaram. Muito obrigada!!!

Às alunas da graduação de Farmácia, Kézia e Jhamine, pela enorme contribuição com as etapas laboratoriais e por se tornarem grandes amigas no decorrer do trabalho. Vocês contribuíram muito para a conclusão deste projeto, muito obrigada meninas!!!

À Coordenação do Mestrado em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa do Coordenador Antônio Márcio Resende do Carmo e do Vice-coordenador Marcio José da Silva Campos.

Às funcionárias do Mestrado, Wanessa e Letícia, pela convivência, dedicação a nossa turma e pela paciência aos nossos inúmeros questionamentos. Por serem além de secretárias nossas grandes amigas. Muito obrigada meninas!

Aos amigos da turma de Mestrado, por compartilharem experiências maravilhosas e dividirem momentos de dificuldade, sempre com muita amizade e companheirismo. Muito obrigada amigos!!!

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa da Diretora Maria das Graças Afonso Miranda Chaves e do Vice-diretor Elton Geraldo de Oliveira Góis.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo incentivo à pesquisa e pelas bolsas concedidas nos anos de 2013, 2014 e 2015.

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

DIAS, B. A. **Verificação da inibição da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme cariogênico em *Streptococcus mutans***. 2015. 94f. Apresentação da Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).

RESUMO

Cáries dentárias resultam de um desequilíbrio metabólico do biofilme dental, formado por bactérias, principalmente estreptococos e lactobacilos. Uma das formas de prevenir o processo carioso seria inibir a formação deste biofilme cariogênico. Este trabalho, portanto, objetiva verificar a inibição da formação de biofilme dentário formado por *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) através da ação de quatro substâncias (epigalocatequina, clorexidina, xilitol e resveratrol), e verificar o provável mecanismo de ação a partir da expressão gênica das enzimas glicosiltransferase (GTF) e frutossiltransferase (FTF). O ensaio de reação de cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizado para quantificar a expressão dos genes. Foram realizados ainda, ensaios de viabilidade celular e para verificação de formação de biofilme após tratamento com as substâncias testes para determinar concentrações em que houvesse inibição da formação de biofilme em condições de viabilidade celular. As concentrações de xilitol, resveratrol e clorexidina que se mostraram eficazes foram 100 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,001 mg/mL, respectivamente, ou seja, concentrações nas quais houve inibição da formação de biofilme sem modificação da viabilidade bacteriana. A epigalocatequina não apresentou uma concentração que proporcionasse inibição de biofilme sem a consequente morte bacteriana. Os tratamentos foram realizados com o xilitol, o resveratrol e a clorexidina, e após realização de RT-qPCR (reação de cadeia de polimerase quantitativa em tempo real de transcrição reversa) foram obtidos os resultados referentes à expressão dos genes *ftf* e *gtfb*. Houve uma diminuição significativa (72,8%) na expressão gênica do *ftf* após o tratamento com xilitol. O resveratrol não interferiu na expressão deste gene e a clorexidina provocou redução da expressão do gene de controle (*housekeeping gene*), inviabilizando a avaliação da expressão do *ftf* na concentração avaliada. Não houve modificação significativa na expressão de *gtfb* após o tratamento com o resveratrol e a clorexidina nas concentrações definidas. O xilitol reduziu a expressão do *housekeeping gene* 16S rRNA, indicando morte celular na concentração testada. Os resultados nos levaram a concluir que as três substâncias - resveratrol, xilitol e clorexidina - atuam como potenciais agentes inibidores de biofilme dentário formado por *S. mutans*. Verificou-se, entretanto, que o xilitol inibe a expressão do gene *ftf*, indicando que o provável mecanismo de ação de tal inibição da formação do biofilme foi através da redução da expressão deste gene do *S. mutans*. A clorexidina já possui reconhecida ação bactericida, entretanto neste trabalho verificamos uma concentração desta substância em que houve inibição de biofilme sem a consequente morte celular. Diante dos achados podemos propor outras formas de aplicação do xilitol e da clorexidina, em odontologia, e também a utilização do resveratrol como um agente inibidor do processo carioso, já que o mesmo é capaz de inibir a formação de biofilme dentário. A inibição do biofilme por estas substâncias seria interessante de modo que não geraríamos um desequilíbrio na flora bacteriana, mantendo, portanto, bactérias que atuam de forma positiva na cavidade bucal. Desta forma, outros estudos laboratoriais e clínicos são necessários

para demonstrar a eficácia de tais substâncias para prevenção ou até mesmo tratamento de cáries dentárias.

Palavras-Chave: cárie; *Streptococcus mutans*; frutossiltransferase; glicosiltransferase.

DIAS, B. A. **Verification of inhibiting the expression of genes involved in cariogenic biofilm formation by *Streptococcus mutans***. 2015. 94f. Apresentação da Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).

ABSTRACT

Dental caries results from a metabolic imbalance in the biofilm, formed by bacteria, especially streptococci and lactobacilli. One way of preventing caries process would be inhibit cariogenic biofilm formation. This work therefore aims to verify the possible inhibition of biofilm formation by Streptococcus mutans (S. mutans) after the treatment with four substances (epigallocatechin, chlorhexidine, xylitol and resveratrol), and to investigate the action mechanism through the expression of the genes glycosyltransferase (GTF) and fructosyltransferase (FTF). The test of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was carried out to quantify the expression of these enzymes. Cell viability assays as well as tests for verification of biofilm formation were also carried out after the treatment with the test substances to determine the concentration when the inhibition of biofilm formation occurred under conditions of cell viability. The xylitol, resveratrol and chlorhexidine concentrations that proved effective were 100 mg/ml, 0.1 mg/ml and 0.001 mg/mL, respectively, concentrations in which there was inhibition of biofilm formation without modification of the bacterial viability. The epigallocatechin didn't demonstrate a concentration that would provide biofilm inhibition without the consequent inhibition of bacterial viability. The treatments were performed with xylitol, resveratrol and chlorhexidine, and after completion of RT-qPCR (reverse transcription real time polymerase chain reaction), they're obtained the results for enzyme expression of FTF and GTFB. There was a significant decrease (72.8%) in the enzyme FTF expression after treatment with xylitol. The resveratrol didn't affect the expression of this enzyme and chlorhexidine caused reduced gene expression control (housekeeping gene), precluding to evaluate the FTF gene expression in the assessed concentration. There was no significant change in GTFB expression after treatment with resveratrol and chlorhexidine in defined concentrations. Xylitol reduced housekeeping gene 16S rRNA expression, indicating cell death in the concentration tested. The results led us to conclude that the three substances (resveratrol, xylitol and chlorhexidine) act as potential dental biofilm inhibitors formed by S. mutans. It was found, however, that xylitol inhibits FTF gene expression, indicating that the probable mechanism of action of such inhibition of biofilm formation was by reducing the expression of this S. mutans gene. Chlorhexidine has already recognized bactericidal action, however this work we see a concentration of this substance that was inhibiting biofilm without subsequent cell death. Considering those findings may suggest other ways of applying the xylitol and chlorhexidine in dentistry and also the use of resveratrol as an inhibitory agent of the carious process, since it is capable of inhibiting dental plaque formation. Biofilm inhibition these substances would be interesting to such an extent that there would generate an imbalance in the bacterial flora, thus keeping bacteria that act in a positive manner in the oral cavity. Thus, clinical studies are necessary to demonstrate the efficacy of these substances to prevent or even caries treatment.

Keywords: caries; *Streptococcus mutans*; fructosyltransferase; glucosyltransferase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Colônia de <i>Streptococcus mutans</i> por microscopia eletrônica de varredura. Aumento de 4.400 vezes.....	31
Figura 2	Esquema da Formação do Biofilme oral a partir da formação de glucanos pelas enzimas GTFs de <i>S. mutans</i>	34
Figura 3	Estrutura química da EGCG (C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁), massa molecular 458,37 g/mol.....	37
Figura 4	Estrutura química do digluconato de clorexidina a 20%.....	38
Figura 5	Estrutura química do xilitol.....	39
Figura 6	Fórmula estrutural do resveratrol (C ₁₄ H ₁₂ O ₃).....	40
Figura 7	Estufa bacteriológica utilizada para armazenamento das cepas....	46
Figura 8	Cabine de fluxo laminar (Trox).....	47
Figura 9	Esquema da diluição para a contagem de unidades formadoras de colônia.....	47
Figura 10	Disposição das substâncias nas placas de polietileno de 96 poços (Ct) – o controle de turvação do meio representa o meio de cultivo BHI e a substância testada. (C-) – o controle negativo representa o poço com meio de cultivo e bactéria.....	50
Figura 11	Espectrofotômetro MultiskanGo Thermoscientific.....	51
Figura 12	Disposição das substâncias em placas de polietileno de 96 poços (Ct) – controle de turvação do meio representa o meio de cultivo BHI + sacarose 0,25% e a substância testada. (C-) – controle negativo representa o poço com meio de cultivo e bactéria.....	53
Figura 13	Agitador de microplacas orbit p2.....	54
Figura 14	Vortex genie 2 Scientific Industries.....	55
Figura 15	Centrífuga 5417R Eppendorf.....	55
Figura 16	Aparelho Nanodrop 2000C.....	56
Figura 17	Tempo e temperatura dos ciclos no termociclador.....	56
Figura 18	Termociclador amplitherm thermal cyclers.....	57
Figura 19	Aparelho StepOnePlus PCR Real Time acoplado a um computador.....	59

Figura 20	Gráfico demonstrando a verificação da viabilidade de <i>S. mutans</i> após tratamento com EGCG em concentrações variadas.....	61
Figura 21	Gráfico demonstrando a porcentagem de biofilme formado por <i>S. mutans</i> em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de EGCG.....	61
Figura 22	Gráfico demonstrando a verificação da viabilidade de <i>S. mutans</i> após tratamento com clorexidina em concentrações variadas.....	63
Figura 23	Gráfico da porcentagem de biofilme formado por <i>S. mutans</i> em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de clorexidina.....	63
Figura 24	Gráfico de verificação da viabilidade de <i>S. mutans</i> após tratamento com xilitol em concentrações variadas.....	64
Figura 25	Gráfico da porcentagem de biofilme formado por <i>S. mutans</i> em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de xilitol.....	64
Figura 26	Gráfico de verificação da viabilidade de <i>S. mutans</i> após tratamento com resveratrol em concentrações variadas.....	67
Figura 27	Gráfico da porcentagem de biofilme formado por <i>S. mutans</i> em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de resveratrol.....	67
Figura 28	Gráfico representando a amplificação do gene <i>ftf</i> após os ciclos nas diferentes temperaturas das substâncias testadas.....	65
Figura 29	Representação gráfica das fases da PCR em tempo real.....	69
Figura 30	Gráfico da expressão da enzima FTF após o tratamento com xilitol, clorexidina e resveratrol.....	70
Figura 31	Gráfico representando a amplificação do gene <i>gtfB</i> após os ciclos nas diferentes temperaturas das substâncias testadas.....	72
Figura 32	Gráfico da expressão da enzima GTFB após o tratamento com xilitol, clorexidina e resveratrol.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência do <i>primer</i> referente à enzima FTF.....	58
Tabela 2	Sequência do <i>primer</i> referente à enzima GTFB.....	58
Tabela 3	Sequência do <i>primer</i> referente ao <i>housekeeping gene</i> 16S rRNA...	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>brain-heart-infusion</i>
CDM	meio definido quimicamente
cDNA	DNA complementar
C _t	limite crítico do ciclo
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGCG	Epigallocatequina galato
EPS	exopolissacarídeos
FTF	enzima frutossiltransferase
<i>ftf</i>	gene da frutossiltransferase
GTF	enzima glucossiltransferase
<i>gtf</i>	gene da glucossiltransferase
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IPS	polissacarídeos intracelulares
MIC	concentração inibitória mínima
PCR	reação de cadeia de polimerase
qPCR	reação de cadeia de polimerase em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reação de cadeia de polimerase de transcriptase reversa
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
sub-MIC	concentração inibitória sub-mínima
TSA	Agar triptona de soja
UFC	unidades formadoras de colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
μ	micro
μg	micrograma
μL	microlitro
g	grama
mg	miligramo
mL	mililitro
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	22
2.1 CÁRIE.....	22
2.2 STREPTOCOCCUS MUTANS E A PLACA DENTAL.....	25
2.3 AS ENZIMAS GLICOSILTRANSFERASE (GTF) E FRUTOSILTRANSFERASE (FTF) E A FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	29
2.4 POTENCIAIS AGENTES COM EFEITO ANTICÁRIE.....	32
2.4.1 Galato de Epigallocatequina.....	32
2.4.2 Clorexidina.....	34
2.4.3 Xilitol.....	35
2.4.4 Resveratrol.....	37
3 OBJETIVOS.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 MATERIAIS E APARELHOS UTILIZADOS.....	40
4.2 ORIGEM E CONSERVAÇÃO DAS CEPAS.....	41
4.3 CONTAGEM DAS COLÔNIAS.....	43
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM S. MUTANS PLANCTÔNICO.....	44
4.5 VERIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	47
4.6 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE S. MUTANS.....	51
4.7 SÍNTESE DE CDNA.....	53
4.8 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	54
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	57
5.2 EXPRESSÃO GÊNICA.....	65
5.2.1 EXPRESSÃO FTF.....	65
5.2.2 EXPRESSÃO GTFB.....	68
CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A placa dental é definida como uma comunidade diversificada de microrganismos encontrados na superfície dentária, caracterizada como um biofilme dental (MARSH, 2004). Os biofilmes dentais são compostos por uma matriz extracelular de polímeros aderidos à superfície do dente que envolve um grupo de microrganismos (ALLISON, 2000; FLEMMING e WINGENDER, 2010).

Cáries dentárias resultam de um desequilíbrio da atividade metabólica neste biofilme dental (NYVAD et al., 2013), que é composto por bactérias cariogênicas altamente eficientes na conversão de carboidratos em ácidos orgânicos, os quais desmineralizam o esmalte do dente (SHEN et al., 2004). No biofilme cariogênico há uma prevalência de estreptococos do grupo *mutans*, principalmente *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e outros microrganismos acidúricos como os lactobacilos e leveduras, os quais produzirão ácidos que resultarão na desmineralização do dente (BANU et al., 2010; KLEINBERG, 2002; MARSH et al., 2005; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002). Estas bactérias são particularmente eficazes no processo de formação da cárie, graças à sua capacidade de sobreviver e de produzir biofilmes no meio ácido das quais originam (FLEMMING e WINGENDER, 2010).

A cárie é considerada um problema de saúde pública em escala global, apresentando alta prevalência na maior parte das populações modernas, especialmente nos países em desenvolvimento (MALTZ e SILVA, 2001; SMITH, 2002).

De acordo com os conceitos de Keys (1960), é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível e dieta-dependente. Newbrum (1983) acrescenta o fato de ela ser um processo crônico que necessita da presença e da interação dos quatro fatores (hospedeiro susceptível, microrganismo, dieta e tempo). Conceitos que atualmente se modificaram já que a cárie não é uma doença transmissível e é principalmente causada pelo consumo excessivo de açúcares (SHEIHAM e JAMES, 2015).

Ao efetivar a adesão inicial ao dente, a bactéria passa a depender de carboidratos para se nutrir e para produzir a matriz polissacarídica extracelular, que permite a adesão efetiva. A enzima glicosiltransferase (GTF) bacteriana é a principal

conversora de açúcares em energia, garantindo a nutrição bacteriana. Esta enzima é responsável por metabolizar glucanos solúveis e insolúveis em água dando origem à matriz polissacarídica, que permite a colonização bacteriana sobre a hidroxiapatita do dente (MATSUMURA et al., 2003; MIRANDA et al., 2001; SMITH, 2002).

A enzima frutossiltransferase (FTF), também produzida por *S. mutans*, produto do gene *fff* (SHIROZA e KURAMITSU, 1988), sintetiza polímeros de frutanos a partir da sacarose (BIRKHED, ROSELL e GRANATH, 1979; BURNE, 1991).

O atrito mecânico é o melhor método para remover o biofilme das superfícies dentárias, podendo ser realizado com escova e fio dental, além de profilaxia profissional dentária e outros meios auxiliares (ÖHRN e SANZ, 2009). Apesar do controle mecânico do biofilme dentário ser o mais efetivo e utilizado pela população, existe evidência de que a motivação e capacidade operacional requeridas estão muito aquém da habilidade necessária para se conseguir a completa eliminação do biofilme supragengival e subgengival. Devido a essa situação, o método de controle químico do biofilme dentário, através da utilização de antimicrobianos presentes em soluções para bochechos e em dentifrícios, vem sendo bastante pesquisado (LOTUFO et al., 2005).

Embora alguns componentes ativos presentes em produtos odontológicos tenham interferência na formação de biofilme, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação e sua atuação a nível genético. Este trabalho, portanto, têm o objetivo de verificar a inibição da expressão das enzimas GTF e FTF de *S. mutans* após a aplicação de substâncias químicas que são utilizadas em alguns produtos – xilitol e clorexidina – e outras que possuem ação antimicrobiana já reconhecida – resveratrol e epigallocatequina. A eficácia das substâncias será avaliada quanto ao potencial antimicrobiano e à capacidade de inibição de formação de biofilme. As substâncias consideradas eficazes serão investigadas quanto ao possível mecanismo de ação a nível genético: a expressão gênica das enzimas GTF e FTF, essenciais na formação do biofilme, será verificada através de reação de cadeia de polimerase em tempo real (qPCR).

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 CÁRIE

Há milênios, o homem deixou de viver exclusivamente da natureza, quando modificou, de alguma maneira, a forma natural dos alimentos. Gerou-se um desequilíbrio da biodiversidade bucal que, a partir desse momento, foi responsável pelo processo de desmineralização e remineralização dentárias fora das condições naturais, possibilitando o desenvolvimento de lesões na estrutura dentária chamadas de cárie dentária (LIMA, 2008).

Cáries dentárias têm sido descritas como uma doença crônica que progride lentamente na maioria dos indivíduos. A doença é inicialmente reversível e pode ser interrompida em qualquer fase mesmo quando uma porção de esmalte ou dentina é destruída (cavitação), desde que o biofilme possa ser suficientemente removido. É raramente autolimitada e, na ausência de tratamento, cáries progridem até que o dente seja destruído. A destruição localizada dos tecidos duros, frequentemente referida a esta lesão, é um sinal ou sintoma desta doença que pode ser visualizada tanto na coroa (cárie coronal) quanto na raiz (cárie radicular) de dentes decíduos e permanentes, e em superfícies lisas assim como em sulcos e fissuras. Pode afetar o esmalte, a cobertura exterior da coroa; o cemento, a camada mais externa da raiz; e a dentina, o tecido abaixo tanto do esmalte quanto do cemento. (FEJERSKOV et al., 2003; SELWITZ, ISMAIL e PITTS, 2007).

A lesão de cárie pode ser evitada e controlada mesmo em situações de alta prevalência, a partir da instituição do “controle periódico” da placa, que deverá ser inversamente proporcional à frequência da dieta cariogênica, permitindo o restabelecimento do equilíbrio da desmineralização-remineralização (“des-re”) e, desse modo, impedindo que novas lesões atinjam a irreversibilidade (LIMA, 2008).

A cariogenicidade da dieta é determinada pela presença de carboidratos, principalmente a sacarose, que servem de substrato para que os microrganismos da cavidade bucal sintetizem polissacarídeos extracelulares com um importante papel na formação da placa e, também, na produção de ácidos orgânicos que promovem a

desmineralização do esmalte e podem desencadear o processo de cárie (BURT, 1988; MANJI e FEJERSKOV, 1990; SREEBNY, 1982).

Bactérias endógenas no biofilme (em grande parte estreptococos [*S. mutans* e *Streptococcus sobrinus*] e *Lactobacillus spp*) produzem ácidos orgânicos fracos, como um subproduto do metabolismo de carboidratos fermentáveis (CAULFIELD e GRIFFEN, 2000; FEJERSKOV, 2004). Este ácido provoca queda dos valores locais do pH abaixo de um valor crítico, resultando em desmineralização do tecido dentário (FEATHERSTONE, 2000, 2004; CAULFIELD e GRIFFEN, 2000). Se a difusão de cálcio, fosfato e carbonato para fora do dente continuar, ocorrerá a cavitação (FEATHERSTONE, 2004; SEOW, 1998).

A simples presença de microrganismos na cavidade bucal, na saliva ou na placa bacteriana, não é um fator determinante para o aparecimento de cárie, mas sua participação é inquestionável e indispensável, pois a lesão de cárie passa pelo metabolismo bacteriano, culminando no processo fisiológico de “des-re”, não determinando necessariamente a “doença” cárie (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

A suscetibilidade do dente à cárie é determinada pelo grau de mineralização do esmalte, proporcionando maior ou menor resistência à dissolução ácida, cuja mineralização também é regida por fatores intrínsecos que ocorrem durante a formação do dente, e os extrínsecos, que são fatores ambientais e locais. A tentativa de aumentar a resistência do esmalte ao ataque ácido ainda faz parte da conduta terapêutica de profissionais, através do uso de substâncias químicas durante a fase pré e pós-eruptiva do dente, sendo hoje muito contestada a sua eficácia (CURY, 2001).

Fatores de risco físico e biológico para cárie de coroa ou raiz incluem inadequados fluxo e composição salivar, um elevado número de bactérias cariogênicas, exposição insuficiente ao flúor, recessão gengival, componentes imunológicos, necessidade de cuidados de saúde especiais e fatores genéticos (FEATHERSTONE et al., 2003; FEJERSKOV e KIDD, 2003; THOMSON, 2004). Como fatores comportamentais são incluídos: má higiene bucal; maus hábitos alimentares, ou seja, consumo frequente de carboidratos refinados; uso frequente de medicamentos orais que contêm açúcar e outros medicamentos que interferem na produção de saliva; e métodos inadequados de alimentação de bebês (FEJERSKOV e KIDD, 2003; FEATHERSTONE et al., 2003; KROL, 2003; WINN, 2001; TOGER-

DECKER e VAN LOVEREN, 2003). Outros fatores relacionados ao risco de cárie incluem a pobreza, privação ou nível social; número de anos de educação; cobertura de seguro dental; uso de selantes dentários; utilização de aparelhos ortodônticos; e próteses parciais mal desenhadas ou mal ajustadas (CURZON e PRESTON, 2004; FEATHERSTONE et al., 2003; KIDD et al., 2000; KROL, 2003; RAMOS-GOMEZ et al., 2002).

A colonização por *S. mutans* e outras bactérias cariogênicas, em uma idade jovem, pode ser um fator de risco chave para o desenvolvimento de cárie (BERKOWITZ, 2003; SEOW, 1998). Apesar da queda generalizada na prevalência e gravidade de cárie em dentes permanentes em países de alta renda ao longo das últimas décadas, as disparidades continuam e muitas crianças e adultos ainda desenvolvem cárie (BELTRAN-AGUILAR, BARKER e CANTO, 2005; CURZON e PRESTON, 2004; KROL, 2003; PETERSEN e YAMAMOTO, 2005). Outros grupos populacionais de alto risco incluem as pessoas que vivem em situação de pobreza; pessoas com baixo nível educacional ou socioeconômico; grupos de minoria étnica; indivíduos com deficiências de desenvolvimento; indivíduos com vírus da imunodeficiência humana (HIV); pessoas idosas debilitadas e com transtornos psiquiátricos, etc (BELTRAN-AGUILAR, 2005; ETTINGER, 1999; JAMELLI, S. R. et al., 2010; KIDD e JOYSTON-BECHAL, 1997; KROL, 2003; PETERSEN e YAMAMOTO, 2005; SHEIHAM, 2001; TINANOFF, KANELIS e VARGAS, 2002).

A tendência internacional em gestão de cárie é afastar-se do modelo cirúrgico (remoção e substituição do tecido doente do dente) para uma abordagem preventiva, com o objetivo de controlar a iniciação e progressão do processo da doença ao longo da vida de uma pessoa (PITTS, 2004). Durante um longo período, a partir da virada do século 20, dentistas têm pensado na restauração do dente como uma cura para a cárie dentária. Portanto, um grande desafio para o clínico é detectar lesões em uma fase inicial antes de ser necessária uma intervenção cirúrgica (SELWITZ, ISMAIL e PITTS, 2007).

O foco na restauração e conservação de dentes foi um avanço sobre o método de tratamento prévio de extração dentária, e tornou-se amplamente utilizado em um momento em que havia pouco conhecimento sobre a prevenção da cárie, nas quais estas se formavam rapidamente e suas taxas de progressão eram elevadas, entretanto havia poucos dentistas (SELWITZ, ISMAIL e PITTS, 2007).

Na prática clínica, o controle da cárie por tratamento restaurador, apesar de suas limitações e tendência a promover restaurações repetidas (ELDERTON, 1990), ainda é o método preferencialmente escolhido em muitos países. As principais falhas de restauração em uma abordagem de prevenção são a curta durabilidade das restaurações e a propensão à formação de novas cáries em suas margens quando as causas da doença não são removidas (MJOR e TOFFENETTI, 2000). Prevenção de lesões iniciais por remoção meticulosa do biofilme, bem como a aplicação de fluoretos ou colocação de selantes são bem sucedidas na preservação estrutural do dente. Quando é necessária uma intervenção restauradora, a utilização de técnicas micro-restauradoras modernas com novos materiais adesivos também podem preservar a estrutura do dente. Programas eficazes de prevenção de cárie podem utilizar uma extensão das intervenções, incluindo a fluoretação da água ou do sal da comunidade, e, nas escolas, fluoretação da água, programas de escovação, fornecimento de comprimidos com flúor e aplicação de selantes dentários (SELWITZ, ISMAIL e PITTS, 2007).

Portanto, uma maior compreensão do biofilme complexo que existe nas superfícies dos dentes pode ser a chave para um controle mais efetivo da cárie dentária (LIMA, 2008).

2.2 STREPTOCOCCUS MUTANS E A PLACA DENTAL

A microbiota oral humana é composta de centenas de microrganismos que colonizam uma variedade de superfícies, a maioria a superfície dentária, crescendo como um biofilme conhecido como placa dental. A placa dental consiste de ao menos 800 espécies bacterianas (AAS, 2005, 2008; BECKER, 2002; PASTER, 2001, 2006; PREZA, 2008) e é um ecossistema oral dinâmico e extremamente complexo (ASS, 2005; BEIGHTON, 2005; JENKINSON e LAMONT, 2005; MARSH, 2003, 2006; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). As espécies microbianas na placa formam comunidades as quais estabelecem uma seleção de micronichos, funções metabólicas e interações intra e interespecies. (JENKINSON e LAMONT, 2005; KOLENBRANDER, 2006; KURAMITSU, 2007; MARSH, 2003).

A placa bacteriana dental é frequentemente exposta a fatores que desafiam um estado compatível de saúde, incluindo a exposição a alimentos ricos em açúcar e à fumaça do tabaco. Práticas ineficientes e insuficientes de higiene oral, processo

de envelhecimento, fatores genéticos e alterações imunológicas no hospedeiro também afetam o ambiente oral e podem gerar condições que estimulem a microbiota da placa para um estado associado à doença (JENKINSON e LAMONT, 2005; MARSH, 2003).

A associação do *S. mutans* com a cárie dental não era reconhecida, até que em 1960, pesquisadores reavivaram o interesse pela bactéria. *S. mutans* são versáteis microrganismos na etiologia da cárie dental (MENAKER, 1984) e são os principais habitantes da cavidade oral, sendo encontrados em 90% dos humanos (BARATIERI, 1992). *S. mutans* têm sido implicado como o principal agente etiológico da formação de cárie dentária, devido sua prevalência nas lesões de cárie (LILJEMARK e BLOOMQUIST, 1996). A sacarose da dieta é essencial para a acumulação desta bactéria ao dente e para a iniciação da lesão cariosa (RÖLLA, 1989).

O *S. mutans* são bactérias não esporuladas, catalase negativas, possuindo uma parede celular constituída de proteínas, carboidratos e peptidoglicanos (JAWETZ, BROOKS e BULEL, 1998). Microscopicamente as células são cocos gram-positivos, têm morfologia ovalada e medem cerca 0,5 a 0,75 μm de diâmetro, unidas aos pares ou em cadeias curtas ou médias, suas colônias tem tonalidade azul-clara, bordas onduladas e interior granular, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C (figura 1) (BURNET, SCHERP e SCHUSTER, 1978).

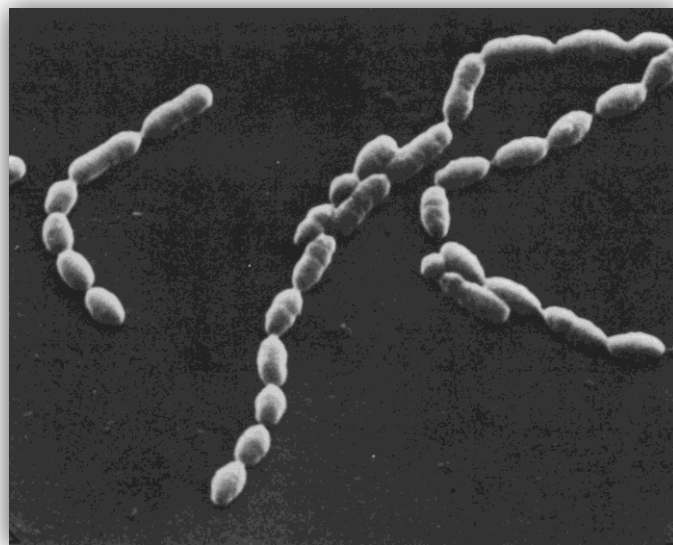


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de cepa de *SM OMZ176* (sorotipo d) crescendo em caldo de glicose. Fonte: BOWEN, 1969.

Placas cariogênicas são compreendidas por numerosas espécies microbianas, incluindo *S. mutans* e outros estreptococos (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus anginosus*), *Rothia*, *Actinomyces*, *Lactobacilli* e *Bifidobacterium spp.* e *Candida albicans* (ASS, 2008; BECKER, 2002; BEIGHTON, 2005; MUNSON, 2004; PREZA, 2008).

Em geral, os biofilmes são comunidades estruturadas de células microbianas que são ligadas a uma superfície e envolvidas numa matriz extracelular tridimensional. A matriz extracelular proporciona uma estrutura essencial para o desenvolvimento do biofilme, promovendo a adesão microbiana a superfícies e coesão, assim como dificultando a difusão. É composta por uma variedade de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas. Exopolissacarídeos (EPS), proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e lipo-oligossacárideos foram identificados nas matrizes de uma variedade de biofilmes formados na natureza e em vários locais nos seres humanos (FLEMMING e WINGENDER, 2010).

A placa dentária acumula-se preferencialmente em locais inertes que oferecem proteção contra a remoção de forças vigorosas que se aplicam na boca. Fases distintas de desenvolvimento da placa podem ser reconhecidas, incluindo:

- 1) Adsorção de moléculas do hospedeiro e de bactérias à superfície do dente – este filme condicionante (a película adquirida) forma-se imediatamente após a erupção ou limpeza e influencia diretamente o padrão de colonização microbiana inicial (AL-HASHIMI e LEVINE, 1989).
- 2) Transporte passivo de bactérias orais para a superfície do dente – interações físico-químicas fracas de longo alcance entre a superfície celular microbiana e a película aderida ao dente criam uma área de fraca atração que facilita a adesão reversível (BUSSCHER e VAN DER MEI, 1997). Posteriormente, fortes interações de curto alcance entre moléculas específicas na superfície da célula (adesinas) e receptores complementares na película podem resultar em fixação irreversível (JENKINSON e LAMONT, 1997; LAMONT e JENKINSON, 2000).
- 3) Co-adesão dos colonizadores tardios aos colonizadores iniciais aderidos – esta fase também envolve interações interbacterianas específicas adesina-receptor e leva a um aumento na diversidade do biofilme e à formação de estruturas morfológicas incomuns, tais como espigas e rosetas (KOLENBRANDER et al., 2000).

4) Multiplicação dos microrganismos aderidos – a divisão celular leva a um crescimento confluyente e, eventualmente, a um biofilme tridimensional funcionalmente organizado de culturas mistas, sendo resultado da produção de polímeros na formação de uma complexa matriz extracelular constituída por glucanos solúveis e insolúveis, frutanos e heteropolímeros (ALLISON, 2000).

5) Desligamento ativo – bactérias podem responder a evidências ambientais e desligar das superfícies, permitindo que as células colonizem outros lugares (CAVENDON e LONDON, 1993; LEE et al., 1996).

Uma vez estabelecida, a microbiota da placa residente mantém-se relativamente estável ao longo do tempo e torna-se um benefício para o hospedeiro (MARSH, 2000). A microbiota residente de todos os sítios tem um papel crítico no desenvolvimento normal da fisiologia do hospedeiro e reduz também as chances de infecção por atuar como uma barreira à colonização por espécies exógenas, e frequentemente patogênicas (resistência à colonização) (MCFARLAND, 2000). Mecanismos que contribuem para a resistência à colonização incluem uma concorrência maior por nutrientes e por locais de fixação, produção de fatores inibitórios e criação de condições desfavoráveis de crescimento pela microbiota residente. Portanto, tratamentos devem tentar controlar a microbiota da placa ao invés de buscar sua eliminação (MARSH, 2004).

Polissacarídeos resultantes da ação de exoenzimas de *S. mutans* são os principais constituintes da matriz de biofilmes cariogênicos da placa e são reconhecidos como fatores essenciais de virulência associados à cárie dentária (BOWEN e KOO, 2011). É concebível que o papel principal de *S. mutans* na patogênese da doença reside na sua capacidade de reunir uma matriz polimérica insolúvel e não simplesmente na sua superioridade numérica ou acidogenicidade (GROSS et al., 2012; TAKAHASHI e NYVAD, 2011).

2.3 AS ENZIMAS GLICOSILTRANSFERASE (GTF) E FRUTOSILTRANSFERASE (FTF) E A FORMAÇÃO DE BIOFILME

O *S. mutans* nem sempre é o organismo mais abundante na colonização inicial da superfície do dente. No entanto, ele pode comandar o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos através de exoenzimas, como as glicosiltransferases (GTFs), constituinte da película adquirida e que também se ligam a superfícies microbianas.

As enzimas quebram polímeros de sacarose (e amido), resultando em glucanos solúveis e insolúveis em água e frutose. Estes EPS fornecem inúmeros locais de ligação primários e formam a principal estrutura da matriz em biofilmes cariogênicos (figura 2) (BOWEN e KOO, 2011; FUKUSHIMA, OKADA e OCHIAI, 1993; WIATER, CHOMA e SZCZODRAK, 1999). Além do *S. mutans*, vários outros estreptococos secretam GTF extracelular, que podem contribuir para aderência deles a película e convertendo-os em produtores de glucanos (BOWEN e KOO, 2011; RUSSEL, 1994).

O *S. mutans* produzem três tipos de GTFs – GTFB, GTFC e GTFD – e sua ação cooperativa é considerada essencial para esta adesão celular. A produção de glucanos adesivos a partir da sacarose ocorre pela ação das GTFs, sendo que aqueles mediam a adesão das células à superfície do dente. (COLBY e RUSSELL, 1997). GTFB e GTFC, que atuam principalmente na formação de glucanos insolúveis em água e ricos em ligações α -1,3-glicosídicas, são localizadas na superfície celular de *S. mutans* e codificadas pelos genes *gtfB* e *gtfC*, respectivamente. Por outro lado, a enzima GTFD, que atua na produção de glucanos solúveis em água e ricos em ligações α -1,6-glicosídicas, é liberada na cultura sobrenadante e codificada pelo gene *gtfD*. GTFC é adsorvida ao esmalte dentro da película enquanto GTFB liga-se avidamente a bactérias que promovem agregação de células e aumento da coesão da placa. GTFD forma um polissacarídeo solúvel e prontamente metabolizável e age como um iniciador para GTFB. O comportamento de GTFs solúveis não reflete ao que é observado com as enzimas de superfície adsorvidas. As GTFs em diferentes regiões oferecem alvos quimioterapêuticos para prevenir a cárie. No entanto, agentes que inibem estas enzimas em solução frequentemente têm reduzido ou nenhum efeito sobre enzimas adsorvidas. Claramente, alterações conformacionais e reações de GTFs sobre superfícies são complexas e modulam a patogênese da cárie dentária *in situ*, merecendo uma investigação mais aprofundada (BOWEN e KOO, 2011; KURAMITSU, 1993).

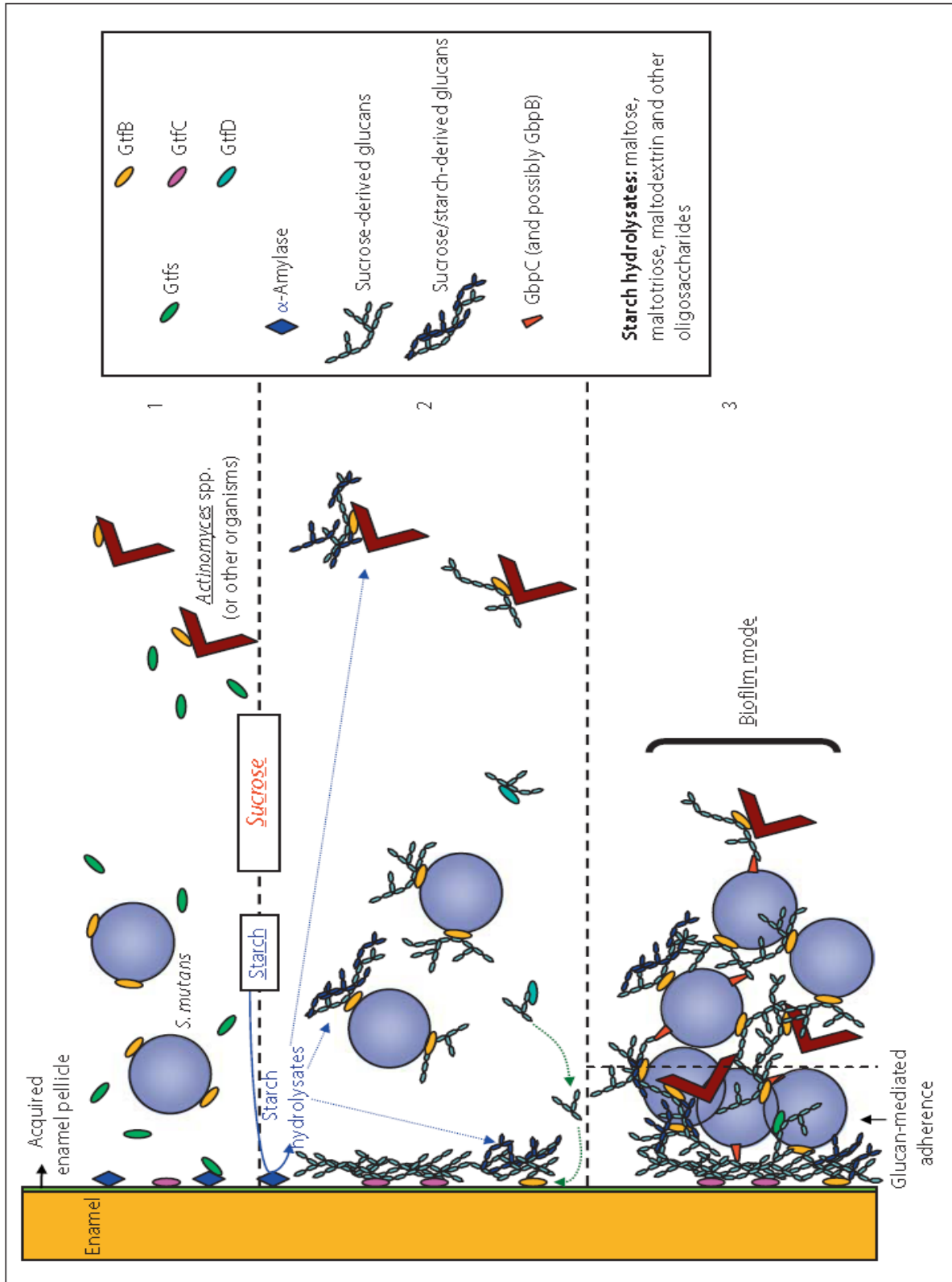


Figura 2. Esquema da Formação do Biofilme oral a partir da formação de glucanos pelas enzimas GTFs de *S. mutans*. Proposto por Röllä et al. (1983) e revisado por Bowen e Koo (2011).

O mau funcionamento de GTFs em valores mais baixos de pH pode levar à diminuição da produção de EPS e IPS (polissacarídeos intracelulares). Estes últimos podem ser metabolizados quando há pequena quantidade de substratos fermentáveis exógenos na cavidade bucal (BUSUIOC et al., 2009). Portanto, o mau funcionamento de GTFs pode prejudicar tanto a adesão bacteriana à superfície do dente e integridade de biofilme, quanto aumentar o estresse por desnutrição das células de *S. mutans*, devido à reduzida preservação de IPS (XU, ZHOE e WU, 2010).

As enzimas GTFB e GTFC são essenciais no estabelecimento da matriz polissacarídica extracelular do biofilme dental, e GTFB é proposta como responsável por *S. mutans* formarem microcolônias (KOO et al, 2010).

O *S. mutans* produz também uma frutossiltransferase (FTF), o produto de um único gene *fff* (SHIROZA e KURAMITSU, 1988), a qual sintetiza polímeros de frutanos a partir da sacarose (BIRKHED, ROSELL e GRANATH, 1979; BURNE, 1991). A FTF enzimaticamente ativa pode ser encontrada tanto associada à células ou livre das células (secretada) (BERGERON e BURNE, 2001; PABST, CISAR e TRUMMEL, 1979). FTF secretada é encontrada na saliva ou imobilizada ao biofilme da placa dental (DOYLE E CIARDI, 1983).

Cepas de *S. mutans* sorotipo c possuem três FTFs distintas e resultados demonstram que FTF ligada ao glucano é antigenicamente distinta das outras duas. O único tipo de ligação encontrado (ligação- β -1,2) sugere que todos as três FTFs produzem um produto semelhante, embora uma pequena quantidade de ramificação tem sido relatada (BIRKHED et al., 1979; EBISU et al., 1975). No entanto, apenas uma das três FTFs tem a capacidade de se ligar a glucanos (RUSSEL, 1983).

Frutanos podem influenciar a patogênese da cárie dentária servindo como reserva de carboidrato extracelular que pode ser metabolizado pela bactéria durante períodos de privação de nutrientes (BURNE et al., 1996; COLBY e RUSSEL, 1997). A frutose liberada a partir da hidrólise dos frutanos pode entrar na via glicolítica e ser metabolizada para ácido láctico, o qual pode causar desmineralização da superfície do esmalte dentário e contribuir para a formação de cáries (BURNE et al., 1999). Tem sido demonstrado que frutanos promovem o processo de adesão de bactérias orais específicas a superfícies duras (ROZEN et al., 2001).

2.4 POTENCIAIS AGENTES COM EFEITO ANTICÁRIE

Em decorrência da incidência de doenças orais, do aumento da resistência de bactérias aos antibióticos e dos efeitos adversos de alguns agentes antibacterianos usados na odontologia, existe a necessidade de novas alternativas de prevenção e tratamento que sejam seguras, eficazes e econômicas (PALOMBO, 2009).

Métodos mecânicos como escova/dentifrício e utilização do fio dental, quando aplicados de forma eficiente, conseguem promover um correto controle da placa (OWENS et al., 1997; TORRES, 2000). Entretanto, Cury (1999) enfatiza a necessidade de se prescrever substâncias químicas antiplaca para pacientes que tenham dificuldades de manter um correto controle da placa dentária. Dependendo das características do paciente, alguns autores consideram pertinente a realização do controle químico da placa como coadjuvante ao controle mecânico, podendo até substituí-lo por curtos períodos de tempo quando necessário (CARVALHO et al., 1992; CURY, 1999; TORRES, 2000).

Dentre as inúmeras substâncias químicas existentes, quatro compostos se destacam como potenciais agentes para o controle da formação de biofilme, despertando o interesse quanto a possível atuação através das enzimas FTF e GTF de *S. MUTANS*: epigalocatequina galato, clorexidina, xilitol e resveratrol.

2.4.1 Galato de Epigalocatequina

Epigalocatequina-3-galato (EGCG), um constituinte principal do extrato aquoso de *Camellia sinensis* (planta vulgarmente conhecida como chá verde), tem um grande potencial anti-infeccioso, uma vez que inibe o crescimento de vários microrganismos (SHIMAMURA, ZHAO e HU, 2007). Também inibe formação de biofilme (BLANCO et al., 2005) e *quorum sensing* (HUBER et al., 2003; LEE et al., 2009) e auxilia outros antibióticos (HU et al., 2002; ROCCARO et al., 2004; ZHAO et al., 2003) contra bactérias resistentes a concentrações sub-inibitórias mínimas (sub-MICs) destes antibióticos. Bactérias gram-positivas são mais susceptíveis a EGCG (figura 3) (YODA et al., 2004).

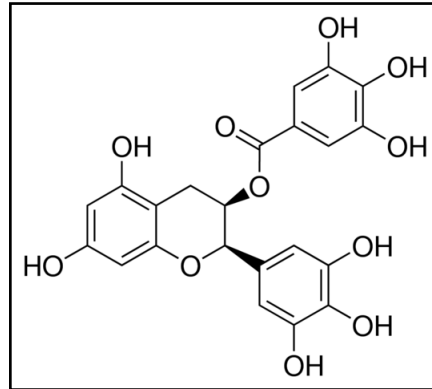


Figura 3. Estrutura química da EGCG ($C_{22}H_{18}O_{11}$), massa molecular 458,37 g/mol.

A EGCG também é um éster composto de epigalocatequina e ácido gálico e é um tipo de catequina, sendo a mais abundante em chás e um polifenol muito investigado devido ao fato de ter um potencial em afetar saúde e doença humanas (LORENZ et al., 2009). Ela é encontrada principalmente no chá branco, chá verde e, em menores quantidades, no chá preto; e em vários vegetais e nozes (BHAGWAT, HAYTOWITZ e HOLDEN, 2011). Os polifenóis são substâncias com uma série de ações benéficas a saúde, dentre as quais atividade anti-inflamatória, antimutagênica, antimicrobiana, anticarcinogênica e contra diabetes (WU et al., 2009).

Na odontologia, o uso terapêutico dos derivados do chá-verde vem sendo proposto na redução da erosão e abrasão dentária (MAGALHÃES et al., 2009), em solução para bochechos (HIRASAWA, TAKADA e OTAKE, 2006; JENABIAN et al., 2012) ou em dentifrícios (MARUYAMA et al., 2011), principalmente em função de seu elevado espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, atuando inclusive contra *S. mutans* e *S. sobrinus* (CAI et al., 2012; HAMILTON-MILLER, 2001; JUNG et al., 2012; SUBRAMANIAM et al., 2012). Ainda por ser biocompatível, a EGCG também foi proposta como meio para a conservação de dentes avulsionados após traumatismos, mantendo a vitalidade de células do ligamento periodontal (HWANG et al., 2011; JUNG et al., 2011). Por apresentar efetiva ação antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis* (CAI et al., 2013; JUNG et al., 2012) e *Enterococcus faecalis*, a EGCG também foi proposta como solução irrigadora dos canais radiculares (PRABHAKAR et al., 2010).

Xu, Zhou e Wu (2012) demonstraram que EGCG em sub-MICs foi capaz de inibir a aderência inicial sacarose-dependente de *S. mutans* levando a consecutiva inibição da formação de biofilme maduro. EGCG pode ser capaz de inibir a adesão

de células à superfície do hospedeiro, interrompendo assim o passo inicial na formação de biofilmes maduros.

2.4.2 Clorexidina

A clorexidina é uma bis-biguanida (base forte), carregada positivamente, praticamente insolúvel em água. Por isso, seu uso em Odontologia é preconizado em forma de sal digluconato, proporcionando uma maior solubilidade à substância (figura 4) (ARAUJO, ARAUJO e CAMPOS, 2001). Possui amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos. Sua eficácia no controle da placa dental vem sendo analisada desde a década de 50. A clorexidina pode ser encontrada veiculada em dentifrícios, géis, vernizes ou soluções, entretanto seu uso em dentifrícios pode ser indevido, pois estes normalmente apresentam detergentes incompatíveis com a clorexidina, reduzindo sua ação (TORRES, 2000).

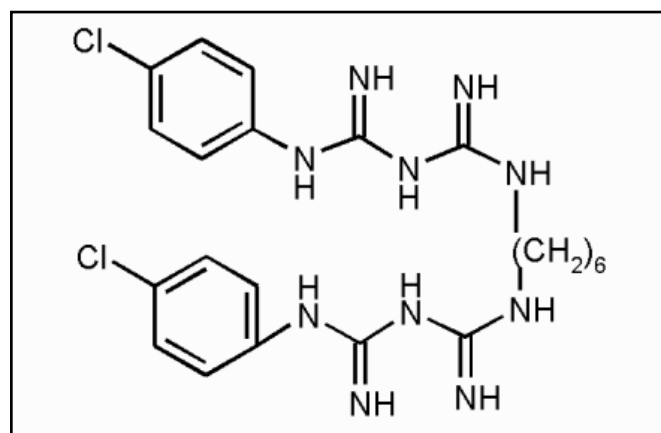


Figura 4. Estrutura química do digluconato de clorexidina.

No tratamento da gengivite tem se mostrado um efetivo agente antimicrobiano, dispersor da placa já formada e inibidor da recolonização da placa bacteriana (CURY et al., 2000). Apresenta-se como uma alternativa na prevenção e no tratamento de doenças bucais, com mínimos efeitos colaterais, baixa toxicidade local e sistêmica e sem alteração da microbiota local (HORTENSE et al., 2010).

Hennessey (1973), verificando as propriedades antimicrobianas da clorexidina, relatou que essa substância apresenta eficiente ação, sendo que os microrganismos gram-positivos são mais sensíveis que os gram-negativos e que os

estafilococos mostraram-se mais resistentes que os estreptococos. Relata também que o mecanismo de ação da clorexidina que resulta em efeito antimicrobiano, começa com sua adsorção na superfície da célula bacteriana, provocando pequenas rupturas na membrana citoplasmática, o que modifica a permeabilidade celular e permite que a droga entre na célula.

Alguns efeitos adversos são atribuídos ao uso oral prolongado, por mais de 14 dias, da clorexidina em enxaguatórios, como: manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade oral, sabor amargo e a interferência na sensação gustativa. Embora existam enxaguatórios com concentração de 0,2%, a utilização de produtos com clorexidina a 0,12% é mais indicada, pois, nessa concentração, são diminuídos os efeitos adversos das soluções mais concentradas, mantendo-se a eficácia contra os microrganismos (PRATTEN, BARNETT e WILSON, 1998).

Apesar de seu potencial reconhecidamente bactericida, a clorexidina deve ser analisada em menores concentrações quanto à inibição da formação de biofilme sem, no entanto, provocar a morte das bactérias.

2.4.3 Xilitol

O xilitol é um composto do grupo dos polióis, ou seja, um álcool, que apresenta um grupo hidroxila em cada átomo de carbono de sua molécula (figura 5). Pode ser encontrado em líquens, fungos, algas e vegetais, e também como um intermediário do metabolismo de carboidratos em animais, inclusive no homem. Em relação à microbiota bucal, ele possui uma propriedade cariostática, impossibilitando a proliferação das bactérias. Apresenta em sua fórmula uma molécula extra de hidrogênio, não causando a formação do ácido láctico. Assim, a maioria das bactérias da placa é incapaz de fermentá-lo em produtos ácidos cariogênicos. Além disso, também pode ser classificado como anticariogênico, pois possui capacidade de estimular a produção de saliva, a qual possui capacidade de tamponamento, induzindo a remineralização e revertendo lesões de cáries dentárias recém-formadas (LIMA e BERLINCK, 2003; MOSS, 1999).

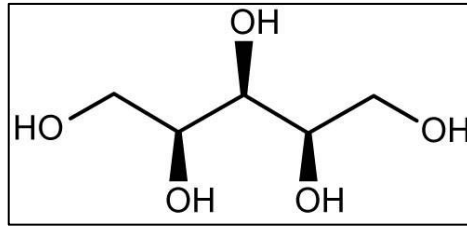


Figura 5. Estrutura química do xilitol.

Embora haja relatos contraditórios em relação à inibição de crescimento de *S. mutans* pelo xilitol, várias hipóteses têm sido introduzidas para explicar seu efeito inibitório (BURT, 2006; LEE, CHOI e KIM, 2012; SÖDERLING, EKMAN e TAIPALE, 2008; SÖDERLING, 2009).

Muitos estudos têm demonstrado que o xilitol tem atividade anticárie mais notável em gomas de mascar e doces. O uso frequente de goma de mascar de xilitol tem sido mostrado como agente na prevenção de cáries (FRAGA, MAYER e RODRIGUES, 2010; TWETMAN, 2009). Apesar da evidência considerável de que o xilitol é um eficaz agente cariostático e preventivo de cárie, não foi desenvolvido um eficaz sistema de aplicação de xilitol exigindo o mínimo de aderência segura, especialmente para crianças. Muitos trabalhos sugerem que um mínimo de 5 a 6 gramas e três exposições diárias é necessário para um efeito clínico ser alcançado. Ao mesmo tempo, há evidências conflitantes na literatura de estudos com dentifrícios de xilitol sugerindo que doses mais baixas e exposições menos frequentes podem ser eficazes (MILGROM, 2009)

Com base nos resultados de estudos sobre a transmissão mãe-filho de *S. mutans*, o consumo habitual do xilitol pode ser recomendado para cuidadores de crianças com idade inferior a dois anos. Consumo habitual de xilitol também pode ser recomendado para pessoas que podem se beneficiar da queda na contagem de *S. mutans* e da quantidade e adesividade da placa. Tais indivíduos são, por exemplo, aqueles que têm um maior risco de cárie como portadores de aparelhos ortodônticos fixos, indivíduos com xerostomia, retardo mental ou deficiência física, e idosos (SÖDERLING, 2009).

2.4.4 Resveratrol

O resveratrol é um composto fenólico, que quimicamente pertence ao grupo dos estilbenos (figura 6). Encontra-se em vários frutos, como uvas, amendoins, e frutos do bosque e noutras partes das plantas como, por exemplo, raízes, como é o caso da sua presença no *Polygonum cuspidatum*. Este último é a fonte mais rica em resveratrol e é muito utilizado na medicina oriental para tratar de doenças hiperlipidêmicas (diabetes), cardiovasculares, hepáticas e inflamação da pele. Nas plantas, o resveratrol é uma fitoalexina sendo sintetizado em resposta a um estresse ambiental, nomeadamente infecções microbianas, radiações UV, variações de temperatura e exposição ao ozônio (BAVARESCO et al., 1998; FREMONT, 2000; SCHUBERT et al., 1997; WU et al., 2001).

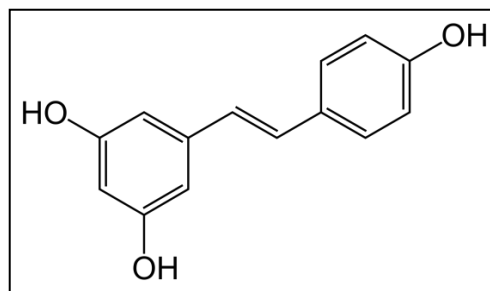


Figura 6. Fórmula estrutural do resveratrol (C₁₄H₁₂O₃).

Várias ações bioquímicas e moleculares parecem contribuir para os seus efeitos contra células pré-cancerosas ou cancerosas. Resveratrol afeta todas as três fases distintas da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) por modulação das vias de transdução de sinal que controlam a divisão e crescimento celular, apoptose, inflamação, angiogênese e metástase, e, portanto, é considerado por alguns como promissor na terapia anticâncer (KRAFT, 2009).

Resveratrol também tem sido objeto de estudo por sua habilidade de inibir o crescimento de alguns microrganismos como bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos (CHAN, 2002; DOCHERTY, FU e TSAI, 2001; MAHADY e PENDLAND, 2000). Muitos microrganismos já foram analisados quanto à ação do resveratrol, no entanto, há poucos estudos que o relacionam ao *S. mutans*.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo verificar a inibição da formação de biofilme dentário formado por *Streptococcus mutans* através da ação de quatro substâncias (epigallocatequina, clorexidina, xilitol e resveratrol), e verificar o provável mecanismo de ação a partir da expressão gênica das enzimas GTF e FTF através de reação de cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

Os objetivos específicos são: avaliar o efeito antimicrobiano das substâncias escolhidas frente à forma planctônica de *Streptococcus mutans*, em concentrações variadas; verificar a inibição da formação de biofilme por *Streptococcus mutans*, em meio enriquecido com sacarose, após a aplicação das substâncias; cruzar os dados obtidos para determinar a concentração a ser verificada na expressão gênica; extrair o RNA total de *S. mutans* após tratamento com as substâncias escolhidas, em concentrações determinadas; e avaliar a expressão dos genes *ftf* e *gtf*, em *Streptococcus mutans*, após tratamento com as substâncias determinadas, por PCR em tempo real.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E APARELHOS UTILIZADOS

O caldo BHI (*brain-heart infusion*) foi adquirido da HIMEDIA (Mumbai, Índia) no qual foi preparada a suspensão bacteriana. O Agar tripton de soja (TSA) foi adquirido da BD (Franklin Lakes, NJ, EUA) e foi utilizado para o plaqueamento da bactéria.

O leite em pó molico (Nestlé®) e glicerol foram utilizados para o preparo do meio *skin-milk*.

A água sanitária e lenços umedecidos foram utilizados para limpeza da cubeta de quartzo.

Os agentes com potencial anticâncer estudados foram:

- 1) Xilitol adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- 2) Digluconato de clorexidina a 20% adquirido de Fagron (São Paulo, Brasil);
- 3) Epigallocatequina adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- 4) Resveratrol adquirido de Gamma Comércio e Importação (São Paulo, Brasil) e importado de Sunji, China.

O Dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido de F. Maia Indústria e Comércio (São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para auxiliar a diluição da clorexidina.

A sacarose 0,25% adquirida de Henrifarma (São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada para a formação de biofilme; e o cristal violeta a 0,05% adquirido de Alamar Tecnocientífica (São Paulo, SP, Brasil), e etanol 70 e 95%, adquirido da empresa Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi utilizado para a fixação do mesmo.

O clorofórmio adquirido de CRQ (São Paulo, SP, Brasil) e o reagente Trizol da Ludwig Biotec (Rio Grande do Sul, Brasil) foram utilizados na etapa de extração de RNA total.

Os reagentes High Capacity cDNA ReverseTranscription e Sybr Green Select Master Mix foram adquiridos da Applied Biosystems (Califórnia, EUA), os quais foram utilizados para síntese de cDNA e como marcador na etapa de qPCR, respectivamente.

Os primers específicos para glicosiltransferase, frutossiltransferase e *housekeeping gene* foram adquiridos de Síntese Biotecnologia (Integrated DNA Technologies, CA, EUA).

Para a realização dos ensaios foram utilizados: fita de autoclave e caneta de retroprojeto; luvas, máscaras e gorros descartáveis; lamparina e isqueiro; placas de Petri; pipetas automáticas de 2,5 µL, 200 µL e 1000 µL e pipeta digital multicanal de 50 µL (Thermoscientific, MA, EUA); ponteiros para pipetas de 2,5 µL, 50 µL, 200 µL, 1000 µL; cubeta de quartzo; tubos de ensaio e falcon; suporte para tubos e suporte para criotubos e tubo cônicos; béqueres de plástico e de vidro e schott; criotubos e tubo cônicos; microplacas de polietileno de 96 poços de 0,1 mL e 0,5 mL; adesivos ópticos e aplicadores de adesivos para microplacas; microtubos com tampa de 0,1 mL e microplacas para PCR de 0,1 mL.

Os equipamentos utilizados foram: autoclave; geladeira; freezer de -20°C; micro-ondas; balança analítica AX200 Shimadzu (Quioto, KYT, Japão); Vortex Genie 2 (Scientific Industries, NY, EUA); lavadora Ultrassônica Unique USC 1400 (Indaiatuba, SP, Brasil); phmetro B 474 Micronal (São Paulo, SP, Brasil); cabine de Fluxo Laminar Trox série 3027 (São Paulo, SP, Brasil) ; estufa bacteriológica novatecnica (Piracicaba, SP, Brasil); espectrofotômetro BIOCHROM Libra S12 (Cambridge, Reino Unido); espectrofotômetro Thermoscientific MultiskanGo (Waltham, MA, Estados Unidos); agitador de microplaca orbit p2 Labnet International (Edison, NJ, EUA); termociclador amplitherm thermal cyclers (Applied Biosystems, CA, EUA); Nanodrop Thermoscientific e centrífuga 5417 R Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

4.2 ORIGEM E CONSERVAÇÃO DAS CEPAS

O microrganismo de referência *Streptococcus mutans* ATCC 25175 foi doado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz (INCQS – FIOCRUZ). Estas cepas foram mantidas em caldo BHI e armazenadas em estufa bacteriológica (Novatecnica NT522) a 37°C (Figura 7).

A manutenção das cepas foi realizada em meio *skin-milk*. Este meio é preparado com leite em pó molico e glicerol. Em oito criotubos foram adicionados 500 µL do *skin-milk* e 500 µL da cepa proveniente do caldo BHI. Após

homogeneização, as cepas foram devidamente identificadas em criotubos e armazenadas no freezer a - 20°C.

Estes procedimentos laboratoriais foram realizados em cabine de fluxo laminar (TROX) (Figura 8) no Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).



Figura 7. Estufa bacteriológica utilizada para armazenamento das cepas.

4.3 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

A cepa do *mutans* foi repicada do meio *skin-milk* para um tubo contendo caldo BHI e após o período de 24 horas foi realizada a padronização do meio com a bactéria (suspensão total) em espectrofotômetro (BIOCHROM Libra S12) (figura 8), de acordo com o procedimento operacional padrão do Núcleo de identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Realizou-se a medição em comprimento de onda de 580 nm em uma taxa de transmitância de 25%. Foi retirado 1 mL desta solução e dispensado em um tubo contendo 9 mL de salina estéril para realização de uma diluição seriada nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-8} . Foi retirado 1mL das diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} e transferidos para placas de Petri e logo após adicionou-se TSA seguindo a técnica Pour-Plate (figura 9), em duplicata. As placas foram incubadas

em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Posteriormente ao período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Em seguida foi calculada a média das duplicatas. Desta forma, foi determinada a diluição que compreendia $1,15 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).



Figura 8. Cabine de fluxo laminar (Trolox).

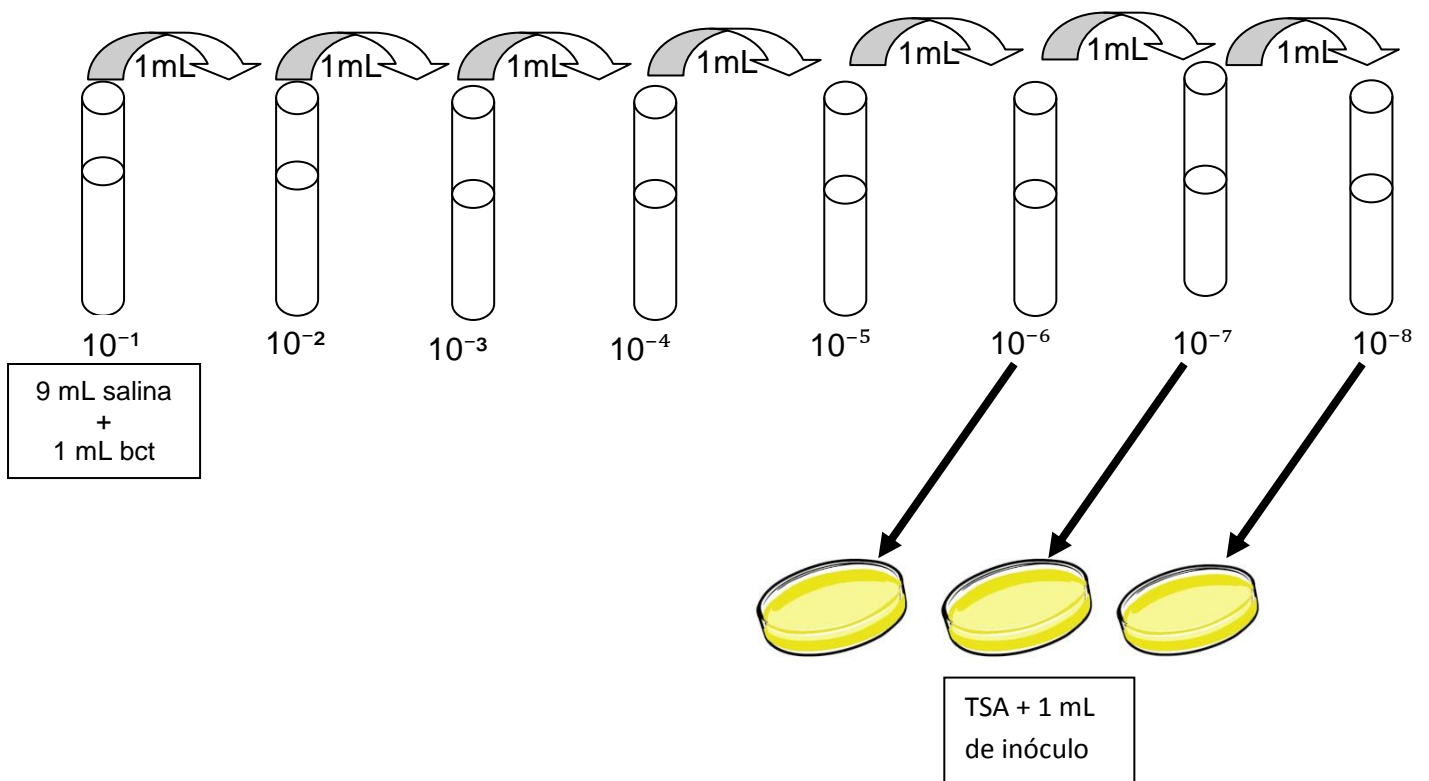


Figura 9. Esquema da diluição para a contagem de unidades formadoras de colônia.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM *S. MUTANS* PLANCTÔNICO

O ensaio para verificar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas sobre o crescimento de *SM* ATCC 25175 foi realizado em triplicata, ou seja, cada concentração de cada substância foi disposta sobre três poços. Foi escolhido o método de microdiluição seriada em caldo BHI em microplacas de cultivo de 96 poços. Diluições seriadas foram realizadas para todas as substâncias em diferentes faixas de concentração. As substâncias foram pesadas em balança analítica AX 200 Shimadzu (Quioto, Japão) para em seguida serem realizadas as diluições. Para cada substância, foram realizadas seis diluições seriadas e aplicadas aos poços, da maior para a menor concentração e em triplicata. Os controles de turvação do meio foram realizados para cada concentração e representavam a substância em caldo BHI sem a presença de bactéria. Os controles negativos do meio foram compostos pelo meio de cultura (BHI) e inoculo, os quais foram realizados em duplicata. A figura 10 representa a distribuição das substâncias na microplaca de cultivo de 96 poços.

A preparação de cada substância para o ensaio procedeu-se da seguinte maneira:

1) Epigallocatequina (EGCG)

Neste estudo foi utilizada a EGCG de massa molecular 458,37 g/mol, derivada do chá verde, apresentada em estado sólido (pó de coloração rosa).

Pesou-se 0,5 mg de EGCG e diluiu-se em 100 µL de água purificada estéril e logo após em 900 µL de caldo BHI. Em seguida homogeneizou-se a solução através de movimentos oscilatórios com a pipeta automática. Prosseguiu-se com as diluições seriadas em concentrações variando de 0,1 mg/mL a 0,5 mg/mL.

2) Clorexidina

O digluconato de clorexidina a 20% apresentou-se como um líquido amarelo transparente de fórmula química $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}2C_6H_{12}O_7$.

Inicialmente preparou-se uma solução matriz na concentração de 400 µg/mL, através da diluição prévia de clorexidina em DMSO, da seguinte forma:

Pipetou-se 3 µL de clorexidina a 20%, adicionou-se 40 µL de DMSO (4%) e homogeneizou-se com a pipeta. Foi adicionado 957 µL de caldo BHI e

homogeneizou-se novamente. Logo após, prosseguiu-se com as diluições em caldo BHI para a obtenção de concentrações variando de 0,0001 mg/mL a 0,0015 mg/mL.

3) Xilitol

O xilitol é um açúcar e, portanto, apresenta-se sob a forma de cristais brancos.

Uma quantidade de 1 g de xilitol foi diluída em 100 µL de água purificada estéril e 900 µL de caldo BHI. Em seguida, a solução foi aquecida em banho-maria para sua completa diluição. Prosseguiram-se as diluições seriadas com concentrações variando de 5 mg/mL a 1000 mg/mL.

4) Resveratrol

O resveratrol apresentou-se como um pó de coloração amarelada com pouca solubilidade em água.

Pesou-se 1 mg de resveratrol e o diluiu em 40 µL de DMSO e em 960 µL de caldo BHI. Em seguida procedeu-se a homogeneização e as diluições, com concentrações variando de 0,02 mg/mL a 1 mg/mL. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas para a posterior leitura em espectrofotômetro MultiskanGo (Thermoscientific, Waltham, EUA) (Figura 11) em comprimento de onda de 580 nm, de acordo com o procedimento operacional padrão do laboratório de bioquímica da UFJF. O resultado foi expresso como porcentagem de células viáveis em relação ao controle negativo \pm desvio padrão, após a dedução do valor de turvação do meio mais a substância teste.

Após a determinação das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano de *S. mutans*, foi realizado um ensaio para a verificação da formação de biofilme.

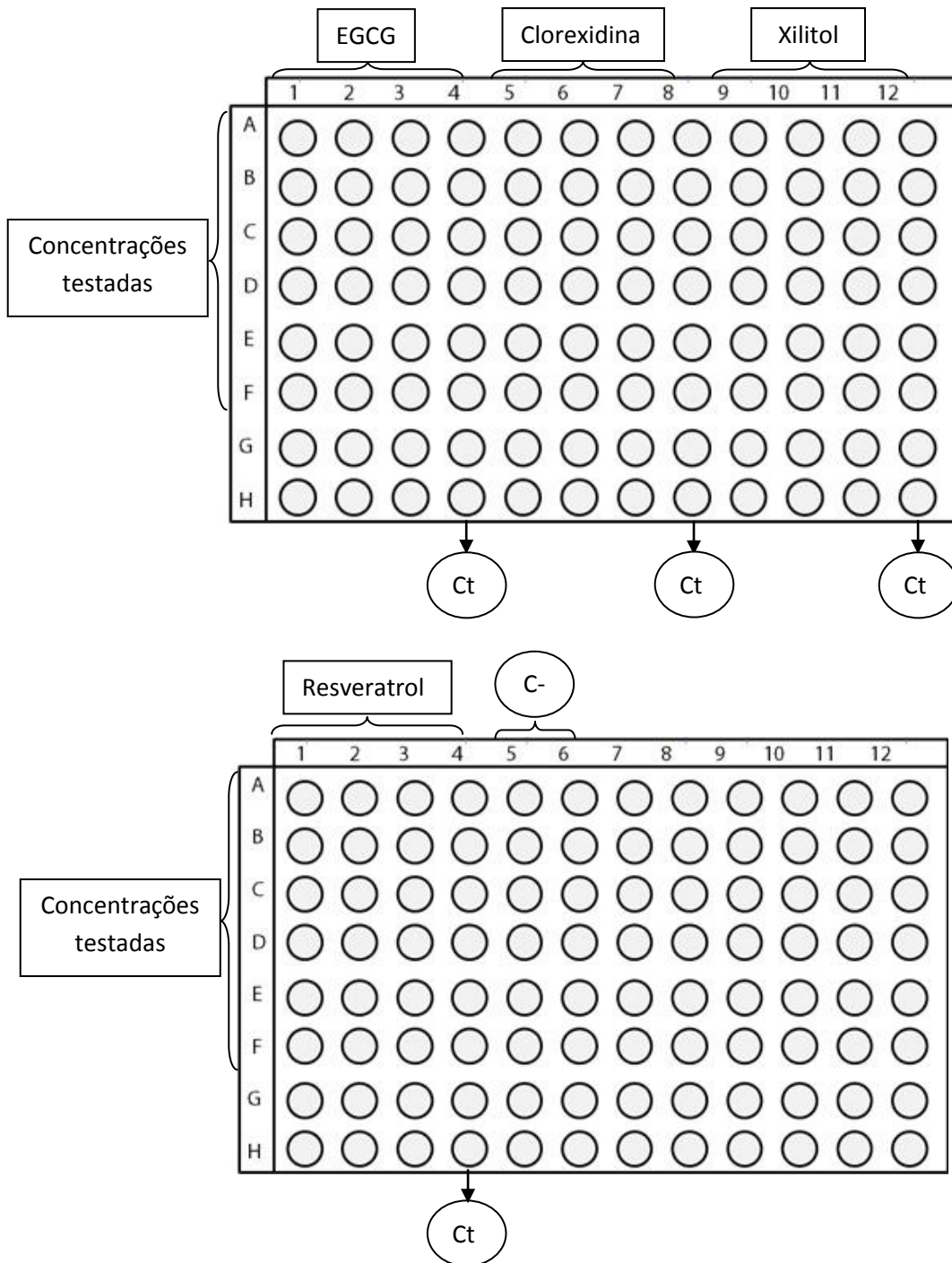


Figura 10. Disposição das substâncias nas placas de polietileno de 96 poços (Ct) – o controle de turvação do meio representa o meio de cultivo BHI e a substância testada. (C-) – o controle negativo representa o poço com meio de cultivo e bactéria.



Figura 11. Espectrofotômetro MultiskanGo (Thermoscientific).

4.5 VERIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

O ensaio para a verificação da formação de biofilme por *S. mutans* ATCC 25175 após a aplicação de substâncias foi adaptado de Lombardo Bedran et al. (2013). Foi escolhido o método de microdiluições seriadas em caldo BHI com sacarose 0,25% em microplacas de cultivo de 96 poços. Diluições seriadas foram realizadas para todas as substâncias em diferentes faixas de concentração. Para cada substância, foram feitas seis diluições seriadas e colocadas nos poços, da maior para a menor concentração e em triplicata. Os controles de turvação do meio foram feitos para cada concentração e representavam a substância em caldo com sacarose 0,25% sem a presença de bactéria. Os controles negativos eram compostos pelo caldo BHI com sacarose 0,25% e inóculo e foram realizados em duplicata. As concentrações de cada substância foram realizadas em triplicata. A figura 12 ilustra a distribuição das substâncias nas placas de 96 poços.

A preparação de cada substância para o ensaio procedeu-se da seguinte maneira:

1) Epigallocatequina

Pesou-se 0,5 mg de EGCG e diluiu-se em 100 μ L de água purificada estéril e logo após em 900 μ L de caldo BHI com sacarose 0,25%. Em seguida homogeneizou-se a solução através de movimentos oscilatórios com a pipeta automática. Prosseguiram-se as diluições seriadas em concentrações variando de 0,5 mg/mL a 0,1 mg/mL.

2) Clorexidina

Foi preparada uma solução matriz na concentração de 400 µg/mL da seguinte forma: pipetou-se 3 µL de clorexidina a 20%, adicionou-se 40 µL de DMSO (4%) e homogeneizou-se com a pipeta. Foi adicionado 957 µL de caldo BHI com sacarose 0,25% e homogeneizou-se novamente. Logo após, prosseguiu-se com as diluições em concentrações variando de 0,0001 mg/mL a 0,0015 mg/mL.

3) Xilitol

Uma quantidade de 1 g de xilitol foi diluída em 100 µL de água purificada estéril e 900 µL de caldo BHI com sacarose 0,25%. Em seguida, a solução foi aquecida em banho-maria para sua completa diluição. Prosseguiram-se as diluições seriadas com concentrações variando de 5 mg/mL a 1000 mg/mL.

4) Resveratrol

1 mg de resveratrol foi pesada e diluída em 40 µL de DMSO e logo após em 960 µL de caldo BHI com sacarose 0,25%. Em seguida procedeu-se a homogeneização após as diluições, com concentrações variando de 0,02 mg/mL a 1 mg/mL.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas. Após esse período, fez-se a aspiração com pipeta do sobrenadante de cada poço, os quais em seguida foram lavados duas vezes com salina tamponada estéril (PBS). Adicionaram-se 100 µL de cristal violeta 0,05% a cada poço e deixou agir por 10 minutos, permitindo que o biofilme fosse fixado. O cristal violeta foi aspirado com auxílio da pipeta e os poços foram lavados duas vezes com PBS para remover o corante não ligado. As placas foram colocadas em estufa para secagem por 2 horas. Após o período de incubação, a cada poço foi adicionado 100 µL de etanol a 95% e a microplaca foi agitada no agitador de microplacas orbit p2 (figura 13) por 10 minutos para que o corante do biofilme fosse liberado. Na sequência foi feita a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm, quantificando assim a formação de biofilme. O resultado foi expresso como porcentagem de biofilme em relação ao controle negativo (sem tratamento) ± desvio padrão.

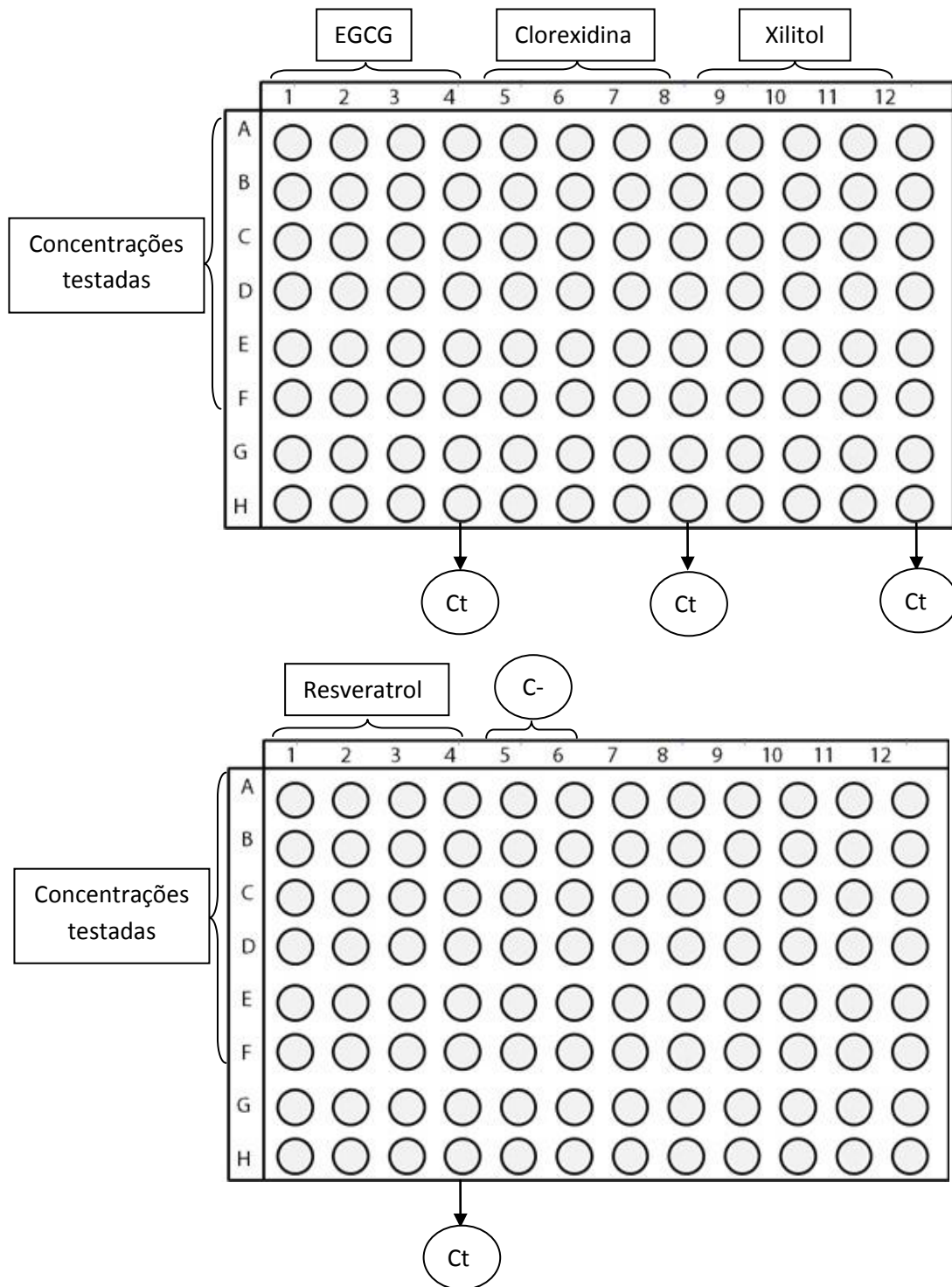


Figura 12. Disposição das substâncias em placas de polietileno de 96 poços (Ct) – controle de turvação do meio representa o meio de cultivo BHI + sacarose 0,25% e a substância testada. (C-) – controle negativo representa o poço com meio de cultivo e bactéria.



Figura 13. Agitador de microplacas orbit p2.

4.6 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE *S. MUTANS*

A extração do RNA (ácido ribonucleico) bacteriano foi feita após 48 horas decorrentes do tratamento em placa de 12 poços, de acordo com as concentrações determinadas anteriormente para a clorexidina, resveratrol e xilitol. Os poços foram constituídos de 900 μL da diluição bacteriana e 100 μL da substância testada.

O trizol foi utilizado para extrair o RNA do *S. mutans* de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente os poços foram transferidos para tubo cônicos devidamente identificados. O passo de lise e homogeneização correspondeu a adição de 1mL de trizol a cada poço, sendo rinsado e transferido para cada tubo cônico correspondente. Após 5 minutos foi adicionado 200 μL de clorofórmio a cada tubo cônico para assegurar uma completa dissociação do complexo proteína-ácido nucleico. A mistura foi ao vórtex (Figura 14) durante 15 segundos e depois descansou por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada em centrífuga 5417 R Eppendorf (Figura 15) a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O passo anterior foi realizado novamente para assegurar eficiência. A fase aquosa foi transferida para tubos cônicos limpos e adicionada de 500 μL de isopropanol, sendo homogeneizada logo a seguir por inversão. A amostra repousou por 10 minutos à temperatura ambiente e foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o

RNA sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (mistura por inversão). O sobrenadante foi novamente descartado e o RNA foi dissolvido em 25 μ L de água livre de RNase, utilizando uma pipeta para facilitar a dissolução, e em seguida o RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm de comprimento de onda em aparelho Nanodrop 2000C (Thermoscientific) (figura 16) acoplado a um computador para a realização da leitura.



Figura 14. Vortex genie 2 (Scientific Industries).



Figura 15. Centrífuga 5417R (Eppendorf).



Figura 16. Nanodrop 2000C (Thermoscientific).

4.7 SÍNTESE DE CDNA (RT-PCR)

O passo seguinte foi a conversão de RNA total para cDNA (DNA complementar), por PCR de transcriptase reversa (RT-PCR). A conversão foi realizada de acordo com os protocolos do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, CA, EUA), após padronização da concentração de RNA extraída de cada tratamento.

Uma mistura de 2x Reverse Transcription Master Mix foi preparada para ser adicionada ao RNA total, criando uma mistura de 1x. Posteriormente, a transcrição reversa (transcrição para cDNA) foi levada ao termociclador amplitherm thermal cyclers (figura 18) para em seguida serem utilizadas para a quantificação da expressão de genes de interesse por qPCR.

Esta etapa foi realizada no laboratório de cultura de células da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), e a programação do termociclador corresponde à figura 17:

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	25	37	85	4
Time	10 min	120 min	5 min	∞

Figura 17. Tempo e temperatura dos ciclos no termociclador.



Figura 18. Termociclador amplitherm thermal cyclers.

4.8 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

A etapa de qPCR foi baseada na metodologia utilizada por Xu, Zhoe e Wu (2012). Amplificação, detecção e análise do cDNA foram realizadas com o aparelho StepOnePlus Real Time PCR (figura 19) e software StepOnePlus v. 2.3 (Applied Biosystems) e com o intercalante SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os primers utilizados para a enzima GTFB e para a enzima FTF foram obtidos pela página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> através da ferramenta Primer-BLAST. O primer utilizado para o *housekeeping gene* 16S rRNA foi obtido do trabalho de Xu, Zhoe e Wu (2012). As sequências estão descritas nas Tabelas 1, 2 e 3. A GTFB foi escolhida por ter sido proposta como um marcador para a atividade da cárie dentária (VACCA-SMITH et al., 2007). Sua importância na fisiopatogenia da doença levou à elaboração de estratégias de prevenção tais como vacinas e bloqueio por meio de substâncias naturais (BOWEN 1996; CULSHAW et al., 2007; SMITH et al., 2005).

A mistura reacional (total de 20 μ L) continha 10 μ L de 1x de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μ L da amostra de cDNA, 4 μ L do primer reverso e 4 μ L do primer *forward* de cada sequência. Esta mistura foi dispensada em uma microplaca de 96 poços, com capacidade de 100 μ L cada poço (Applied Biosystems), própria para procedimentos de qPCR. Condições de PCR incluíam uma desnaturação inicial em 95°C por 10 minutos, seguida por uma amplificação de 45 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e

extensão a 60°C por 1 minuto. Uma nova desnaturação foi realizada a 95° C por 15 segundos, seguido por novo anelamento e extensão a 60° C por 1 minuto. O limite crítico do ciclo (C_t) foi definido como o ciclo em que a fluorescência se tornou detectável acima da fluorescência de fundo e foi inversamente proporcional ao logaritmo do número de moléculas iniciais do molde. Uma curva padrão foi representada graficamente para cada conjunto de *primers* com os valores de C_t obtidos a partir de amplificação de quantidades conhecidas de cDNA de *S. mutans*. As curvas padrão foram utilizadas para a transformação dos valores de C_t para o número relativo de moléculas de cDNA.

A etapa de PCR em tempo real foi realizada no Laboratório de Pós Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

FTF	Sequência (5' – 3')
Primer forward	CTAACTATGGCGGCAGCTCT
Primer reverso	CCCAGCTTGCACGGTTATACA

GTFB	Sequência (5' – 3')
Primer forward	TATTTTAGGGCGCGGAGCAG
Primer reverso	ACCTTTACCGTCATAAGAGAAACCA

16S rRNA	Sequência (5' – 3')
Primer forward	AGCGTTGTCCGGATTTATTG
Primer reverso	CTACGCATTTACCGCTACA

Tabelas 1, 2 e 3. Sequência dos *primers* referentes às enzimas FTF e GTFB e do *housekeeping gene* 16S rRNA, respectivamente.



Figura 19. Aparelho StepOnePlus PCR Real Time acoplado a um computador.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism 5. Foi realizada análise de variância simples One way ANOVA seguido de teste de Tukey. O nível de significância foi determinado em $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME

Foi verificado que o tratamento com EGCG diminuiu a viabilidade em células planctônicas de *S. mutans* de maneira significativa na concentração de 0,5 mg/mL (figura 20). Semelhante ao resultado aqui apresentado, Sakanaka et al. (1989) encontraram uma MIC de 0,5 mg/mL e Mankovskaia, Levesque e Prakki (2013) uma concentração inibitória mínima (MIC) de 0,7 mg/mL. Em contraste, Xu, Zhoe e Wu (2011, 2012) encontraram uma MIC de 0,03125 mg/mL em um meio definido quimicamente (*chemically defined medium* – CDM), e MIC de 0,625 mg/mL em BHI suplementado com 1% de sacarose. Os autores sugeriram que há uma possibilidade de proteínas do CDM e do BHI se ligarem ao precipitado do chá de catequinas, comprometendo o efeito antimicrobiano e provocando estas discrepâncias nos MICs.

A concentração de EGCG que inibiu o crescimento planctônico de *S. mutans* (0,5 mg/mL) também foi capaz de inibir a formação de biofilme de *S. mutans*, como pode ser verificado pela figura 21. Por outro lado, concentrações menores que 0,5 mg/mL (0,2 a 0,02 mg/mL) também não foram capazes de inibir a formação de biofilme, assim como observado na viabilidade. Entretanto, Xu, Zhoe e Wu (2011, 2012) verificaram que em concentrações menores (0,0156 mg/mL) do que a MIC encontrada (0,03125 mg/mL) houve uma diminuição da aderência inicial do *S. mutans* à superfície de vidro, havendo portanto uma inibição de formação de biofilme equivalente a 90%. Estes autores fizeram uma comparação da viabilidade do biofilme em diferentes meios de cultivo – meio definido quimicamente (CDM) (SOCRANSKY, DZINK e SMITH, 1985) e BHI – e obtiveram diferentes resultados. Em CDM, a concentração que inibiu a formação de biofilme foi de 0,0156 mg/mL, e em BHI, a concentração que inibiu a formação de biofilme foi de 0,625 mg/mL. Acredita-se, portanto, que o meio de cultivo utilizado no presente trabalho (BHI) seja o principal motivo para a diferença entre os resultados.

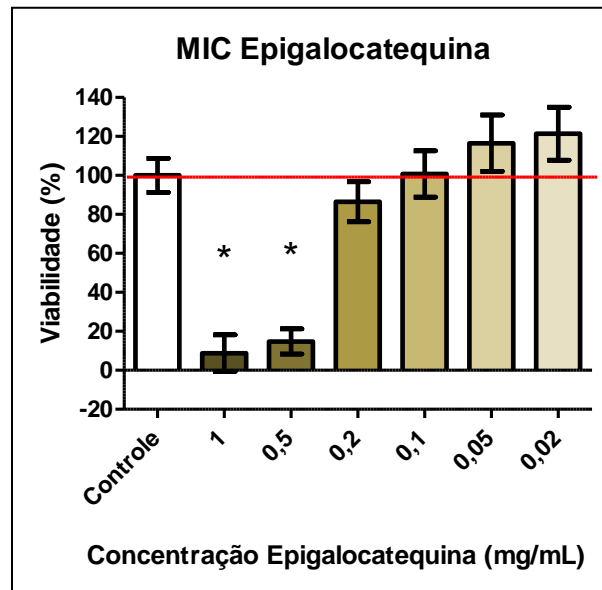


Figura 20. Gráfico demonstrando a verificação da viabilidade de *S. mutans* após tratamento com EGCG em concentrações variadas. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. Tratamentos significativos estão indicados como * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

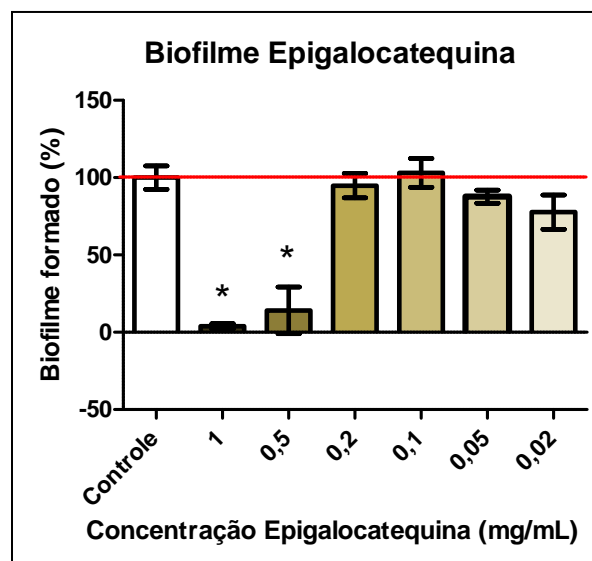


Figura 21. Gráfico demonstrando a porcentagem de biofilme formado por *S. mutans* em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de EGCG. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

A concentração de EGCG de 0,1 mg/mL em que havia 100% de viabilidade de bactérias planctônicas, quando testada para a formação de biofilme, demonstrou não ser capaz de inibir tal formação nas condições verificadas. Tal resultado indica

que a EGCG provavelmente não seria eficaz para inibir a formação de biofilme sem, no entanto, causar a morte das bactérias. Desta forma, o provável mecanismo de ação de tal substância é relacionado com sua atividade antimicrobiana, e não com a inibição da formação de biofilmes. Assim, não se faz necessário a verificação da supressão genética de tal substância em *S. mutans* com qPCR. Por outro lado, no trabalho de Xu, Zhoe e Wu (2012), os autores afirmam que EGCG em quantidade abaixo do MIC (0,0156 mg/mL) inibe significativamente a expressão dos genes *gtf B*, *C* e *D* em 60,88%, 60,49% e 66,37%, respectivamente, comparado ao grupo controle não tratado após análise por qPCR. Os autores puderam concluir que EGCG em níveis subletais é capaz de reduzir a formação de biofilmes de *S. mutans* pela supressão da expressão de GTFs associadas à aderência celular e formação de biofilme, o que não foi observado no presente trabalho.

A clorexidina apresentou redução significativa da viabilidade de *S. mutans* na concentração de 0,0015 mg/mL (figura 22). A inibição de formação de biofilme por *S. mutans* foi determinada como significativa na concentração de 0,001 mg/mL de clorexidina (figura 23). Alguns estudos apresentaram resultados ligeiramente diferentes, como Dong et al. (2012), no qual encontraram uma MIC em 0,0025 mg/mL em *S. mutans* planctônico. Liu et al. (2012) determinaram a MIC em 0,00063 mg/mL em *S. mutans* planctônico e 0,00125 mg/mL em biofilme. Sob as condições do presente estudo, a concentração que inibiu a formação de biofilme (0,001 mg/mL) demonstrou não ter efeito sobre o crescimento bacteriano de *S. mutans* planctônico, ou seja, as bactérias apresentaram-se com viabilidade de 100% nesta concentração. Desta forma, a menor concentração capaz de inibir o biofilme não promoveu a morte de bactérias isoladas.

Liu et al. (2012) examinaram o efeito de três antimicrobianos (fluoreto de sódio, ampicilina e clorexidina) sobre a desagregação de biofilme de *S. mutans* em concentrações inibitórias mínimas (MICs) – 0,001 mg/mL e 0,002 mg/mL – e concentrações sub-inibitórias mínimas (sub-MICs) – 0.31 µg/ml 0.63 µg/ml. De acordo com a absorbância medida, em comparação ao grupo não tratado, foram expressos os resultados em percentuais de desagregação e células viáveis. A clorexidina apresentou potencial de promover a desagregação de *S. mutans* tanto em sub-MICs quanto em MICs após 3 e 6 horas de tratamento, no entanto, após 1 hora não houve aumento da desagregação. As MICs demonstraram diminuir o percentual de células viáveis desagregadas, sendo assim os autores afirmaram a

importância em considerar a duração e a concentração dos diferentes tipos de tratamentos antimicrobianos.

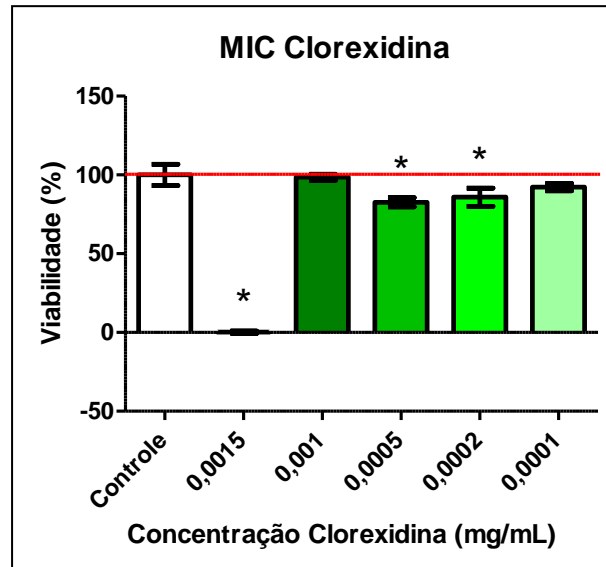


Figura 22. Gráfico demonstrando a verificação da viabilidade de *S. mutans* após tratamento com clorexidina em concentrações variadas. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. Tratamentos significativos estão indicados como * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

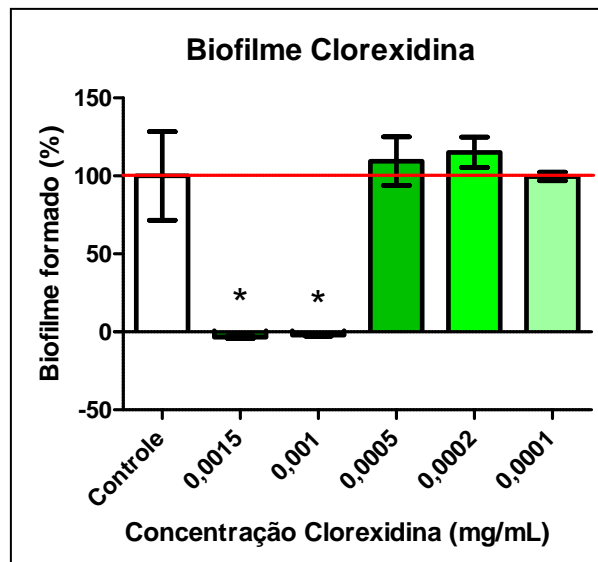


Figura 23. Gráfico da porcentagem de biofilme formado por *S. mutans* em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de clorexidina. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

O xilitol, assim como a EGCG, apresentou a redução da viabilidade média de *S. mutans* e de inibição da formação de biofilme na concentração de 100 mg/mL (Figuras 24 e 25).

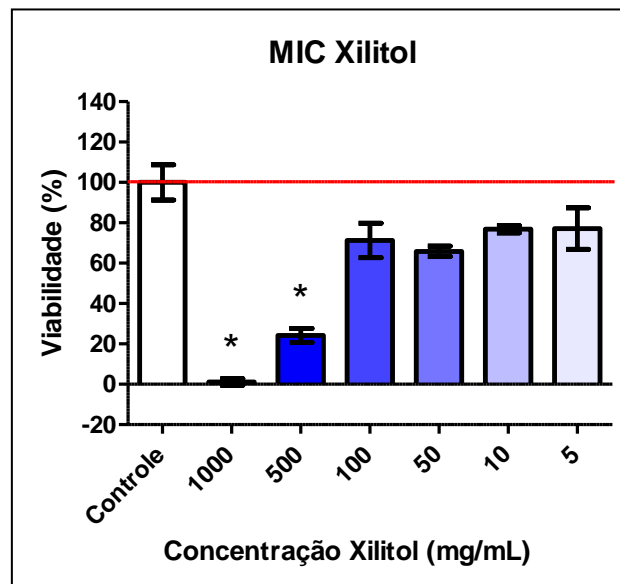


Figura 24. Gráfico de verificação da viabilidade de *S. mutans* após tratamento com xilitol em concentrações variadas. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. Tratamentos significativos estão indicados como * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

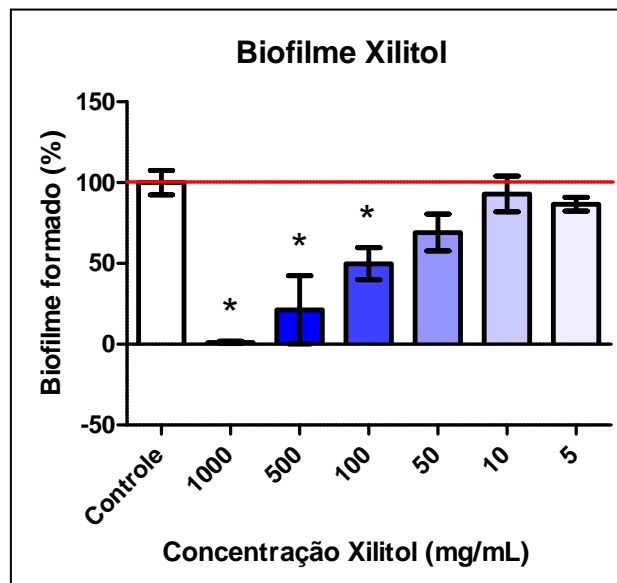


Figura 25. Gráfico da porcentagem de biofilme formado por *S. mutans* em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de xilitol. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

Marttinen et al. (2012) avaliaram o efeito do xilitol em biofilmes formados por *SM* resistentes e sensíveis ao xilitol (X^R) e (X^S), pela técnica de cultura em placas e pela fluorescência e hibridização *in situ* (FISH). A técnica de FISH consistiu em determinar por espectrofluorometria, os polissacárideos extracelulares (EPS) de *S. mutans*. Os autores verificaram que o xilitol a 5% diminuiu em dez vezes o biofilme inicial (8 horas) em cepas X^S , mas não teve efeito em biofilmes maduros (24 horas). Em cepas X^R também não houve diminuição da produção de EPS. Concluíram, portanto, que o xilitol não afetou a síntese de EPS das cepas de *S. mutans*.

Lee, Choi e Kim (2012) compararam, *in vitro*, a formação de biofilme dos *S. mutans* sensível e resistente ao xilitol com a expressão de glicosiltransferases (GTFs), como um fator para investigar o traço cariogênico de *S. mutans* resistente ao xilitol (X^R). Para o estudo foram utilizadas três cepas de *S. mutans* de linhagens diferentes (*S. mutans* Ingbritt, *S. mutans* GS5 e *S. mutans* LM7), e bactérias salivares (*Streptococcus gordonii* ATCC 49818, *S. mitis* ATCC 49456, *S. oralis* ATCC 10557 e *S. sanguinis* ATCC 10556), as quais foram cultivadas em infusão cérebro-coração (BHI), na presença ou ausência de sacarose. As cepas de *S. mutans* foram cultivadas e divididas em resistentes ao xilitol (X^R) e sensíveis ao xilitol (X^S). Em comparação ao *S. mutans* X^S , o *S. mutans* X^R formou menor quantidade de biofilme, o qual abrigou uma menor quantidade de bactérias. O nível de coagregação do *S. mutans* X^R a outras bactérias salivares também foi menor, em presença de sacarose. Por fim, *S. mutans* X^R expressou menores níveis de GTFB e GTFC. Concluíram que o consumo a longo-prazo de xilitol pode diminuir a formação de biofilme oral por diminuir a síntese de glucanos insolúveis em água através da redução da expressão de GTFB e GTFC, comparado as suas cepas progenitoras.

A ação do xilitol a nível celular ainda não está totalmente elucidada. Por este estudo podemos sugerir que um dos possíveis mecanismos de ação desta substância é a de atuar sobre algumas enzimas bacterianas, neste caso, as GTFs ou FTFs. Em nosso trabalho verificamos que houve morte celular e inibição de formação de biofilme em concentrações semelhantes, mas sem a presença de outros microrganismos, o que pode explicar esta diferença nos resultados.

As concentrações testadas de resveratrol foram 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,02 mg/mL. A concentração de redução significativa da viabilidade em *S. mutans* planctônico foi 0,2 mg/mL (Figura 26). Todas as concentrações inibiram a formação de biofilme significativamente (Figura

27). O resveratrol demonstrou, desta forma, ser uma substância com potencial para a verificação da expressão genética, uma vez que na concentração de 0,1 mg/mL não ocorreu a morte celular, mas houve a inibição da formação do biofilme. Chan (2002) demonstrou que o crescimento de espécies bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* foi inibido em concentrações de resveratrol de 0,171 a 0,342 mg/mL, estando o valor significativo encontrado aqui para *S. mutans* dentro da faixa descrita por Chan para estes outros microrganismos.

Todas as substâncias apresentaram concentrações capazes de inibir o crescimento bacteriano de *S. mutans* planctônico.

As concentrações das substâncias a serem testadas na análise da expressão gênica foram determinadas comparando-se a viabilidade bacteriana e a formação de biofilme, após tratamento. As concentrações que não provocaram a morte bacteriana e ao mesmo tempo inibiram a formação de biofilme foram escolhidas. Sendo assim, as substâncias escolhidas para análise por biologia molecular e suas concentrações a serem testadas foram: clorexidina (0,001 mg/mL) e resveratrol (0,1 mg/mL). Embora o xilitol não tenha apresentado uma concentração bem definida, com boa viabilidade e alta inibição de biofilme, a mesma substância foi escolhida para avaliação por qPCR, em uma concentração de média viabilidade e alta inibição de biofilme, sendo esta a de 100 mg/mL. A substância epigallocatequina não apresentou uma concentração intermediária de inibição de biofilme e viabilidade, sendo descartada do teste de expressão gênica.

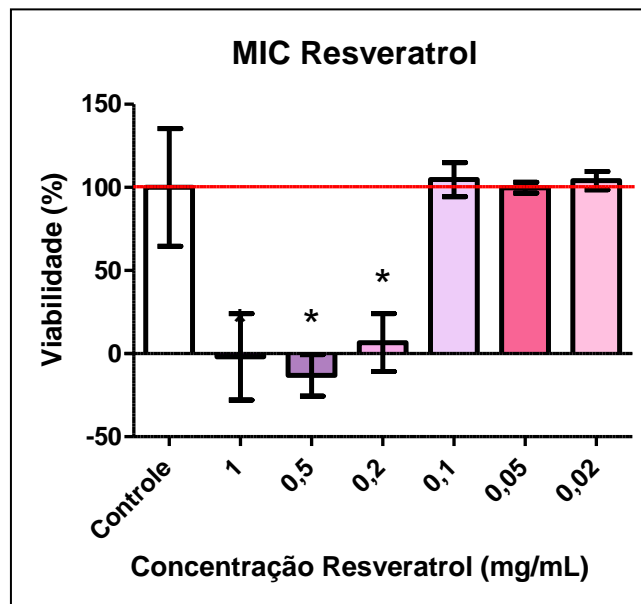


Figura 26. Gráfico de verificação da viabilidade de *S. mutans* após tratamento com resveratrol em concentrações variadas. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. Tratamentos significativos estão indicados como * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

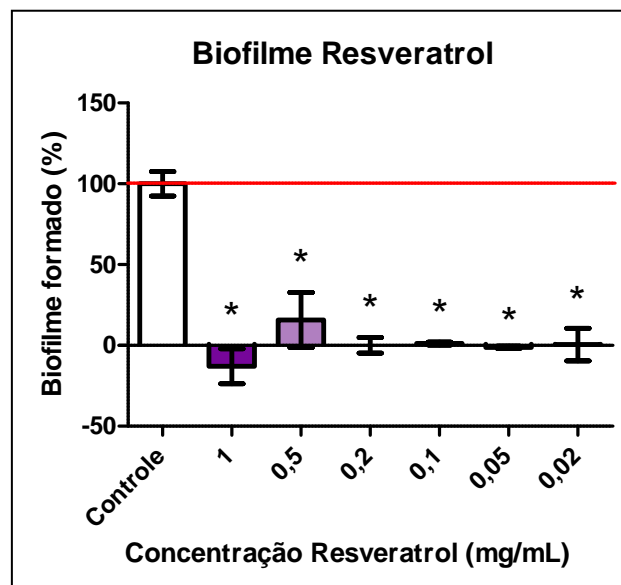


Figura 27. Gráfico da porcentagem de biofilme formado por *S. mutans* em relação ao controle negativo (sem tratamento) após tratamento com concentrações variadas de resveratrol. Resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

5.2 EXPRESSÃO GÊNICA

5.2.1 Expressão FTF

Os resultados obtidos pelo software StepOnePlus são demonstrados graficamente e são representado pela figura 28, correspondendo ao gene *ftf*.

O software realiza a análise dos dados após estabelecimento da threshold line, que se trata de um ponto a partir do qual a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial (figura 29).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism 5 e são demonstrados pelo gráfico da figura 30. Após análise estatística, pôde-se confirmar que houve uma diminuição significativa (72, 8%) na expressão enzimática de FTF após o tratamento com xilitol. O tratamento com resveratrol não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle para a expressão desta enzima.

Embora tenha sido verificada que a concentração de 0,001 mg/mL da substância clorexidina tenha inibido a formação de biofilme e ao mesmo tempo não tenha provocado diminuição da viabilidade bacteriana, pelo teste de qPCR foi verificada que essa mesma concentração causou diminuição da expressão do gene controle 16S rRNA (*housekeeping*). A proteína 16S é essencial para a viabilidade das bactérias, sendo um constituinte do ribossomo. Dessa forma, a redução da expressão deste gene, verificada por RT-qPCR, sugere a redução da viabilidade de *S. mutans* na concentração de 0,001 mg/mL, impossibilitando a análise da expressão dos genes nesta concentração. Portanto, na concentração avaliada, não foi possível determinar a atuação da substância clorexidina na expressão da enzima FTF.

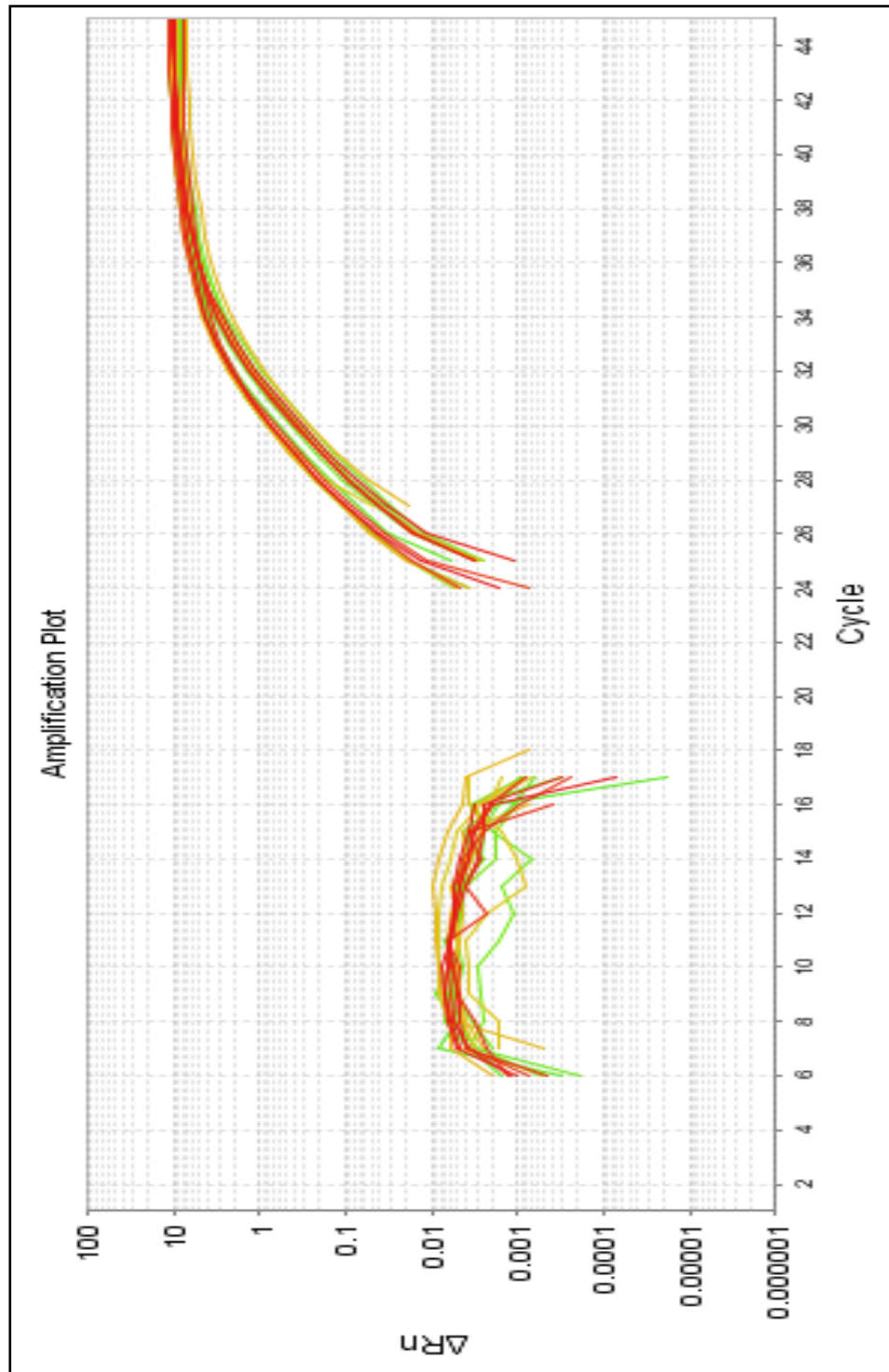


Figura 28. Gráfico representando a amplificação do gene *ftf* após os ciclos nas diferentes temperaturas das substâncias testadas. O eixo y é representado por ΔRn e significa a variação da fluorescência e o eixo X é representado por cycle, que significa a quantidade de ciclos.

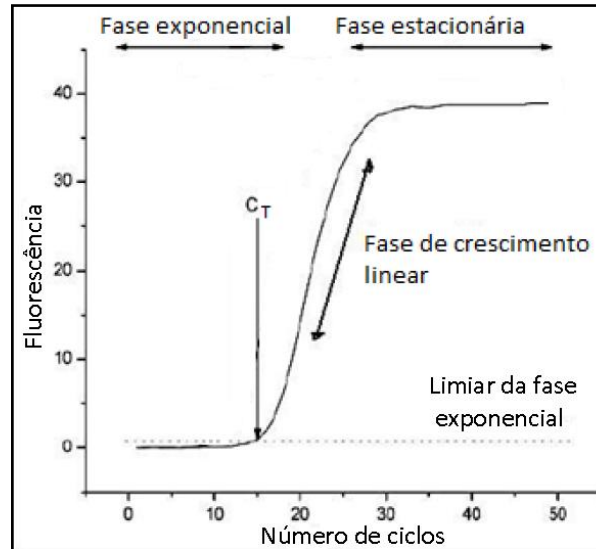


Figura 29. Representação gráfica das fases da PCR em tempo real. Adaptado de Kubista et al., (2006).

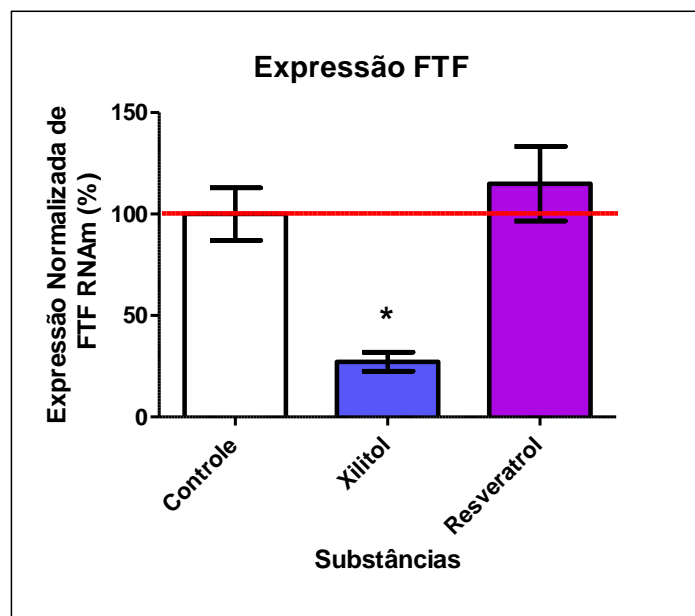


Figura 30. Gráfico da expressão da enzima FTF após o tratamento com xilitol e resveratrol. * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

Steinberg et al. (2002) compararam os efeitos de agentes antiplacas, dentre eles a clorexidina, sobre a síntese de frutanos por FTF extracelular imobilizada a hidroxiapatita ou FTF em solução. As concentrações de clorexidina testadas variaram entre 0,0002% a 0,2% e apresentaram um efeito inibitório significativo na atividade de FTF em solução e na superfície de hidroxiapatita. A atividade de FTF em solução, na presença de 0,2% de clorexidina, diminuiu em 80% comparada ao controle, enquanto a imobilizada a hidroxiapatita diminuiu em 50%. Estes resultados

sugerem que a clorexidina possa atuar na inibição direta da enzima FTF, e não na expressão gênica dessa enzima.

O xilitol promove remineralização por aumento do fluxo salivar e inibe o crescimento e metabolismo bacteriano no biofilme da placa (LY et al., 2006; MILGROM et al., 2006; SÖDERLING, 2009). Em estudos laboratoriais, Söderling e Hietala-Lenkkeri (2010) verificaram que o xilitol reduziu a aderência de estreptococos produtores de polissacarídeos.

De acordo com o trabalho de Shemesh et al. (2006), o xilitol não teve efeito significativo na expressão de *gtfB*, *gtfC* e *ftf*. Já em presença de sacarose, houve um aumento significativo na expressão destes genes, o que demonstrou que a produção das enzimas FTF e GTF é regulada por carboidratos.

Segundo Bahador, Lesan e Kashi (2012), o consumo de goma de mascar de xilitol por um período de 3 semanas reduziu os níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* (bactérias cariogênicas) na saliva e não afetou os níveis de *S. sanguinis* e *S. mitis*, reconhecidas bactérias orais benéficas. Da mesma forma, ElSalhy, Zahid e Honkala (2012) demonstraram que a utilização de enxaguantes bucais com 20% de xilitol 5 vezes ao dia por 4 semanas provocaram reduções significativas nos níveis salivares de *S. mutans*. Já Söderling et al. (2008), ao testarem a inibição de crescimento de *S. mutans* com baixas concentrações de xilitol (0,001% a 1%) verificaram que na menor concentração testada não houve inibição de crescimento de nenhuma das cinco cepas testadas, o que está de acordo com nossos achados.

Até o presente momento não foram realizados estudos relacionando o resveratrol à expressão enzimática de FTF em *S. mutans*.

5.2.2 Expressão GTFB

Na primeira análise realizada com os primers descritos no artigo de Xu, Zhoe e Wu (2012) para a enzima GTFB, nas condições avaliadas, não houve amplificação da expressão de GTFB. Após a escolha e construção de novos primers, utilizando a ferramenta Primer-BLAST, novo ensaio foi realizado. A curva de amplificação de GTFB com a utilização dos novos primers, bem como a representação gráfica de sua expressão, é demonstrada pelas figuras 31 e 32.

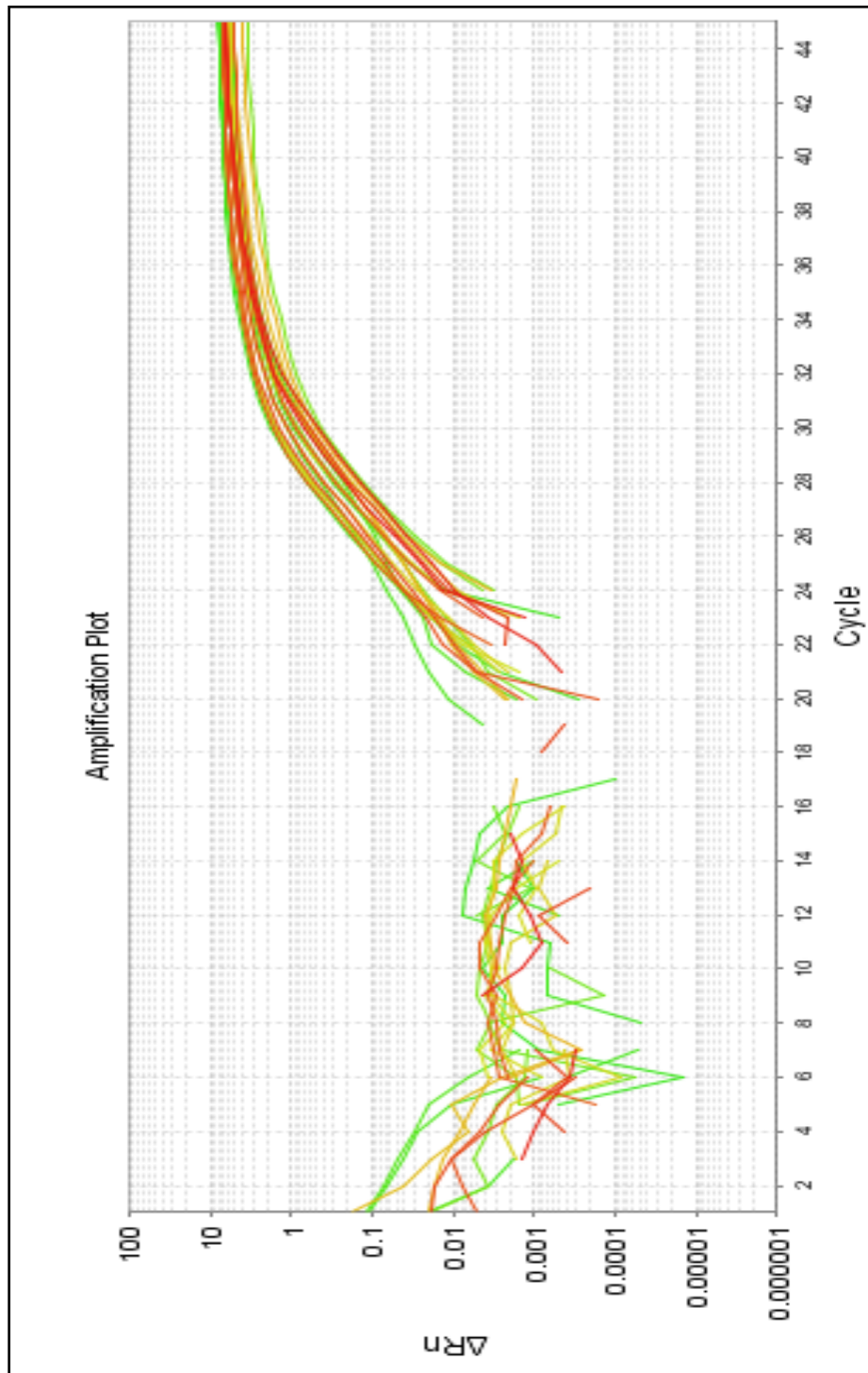


Figura 31. Gráfico representando a amplificação do gene *gtfB* após os ciclos nas diferentes temperaturas das substâncias testadas. O eixo y é representado por ΔRn e significa a variação da fluorescência e o eixo X é representado por cycle que significa a quantidade de ciclos.

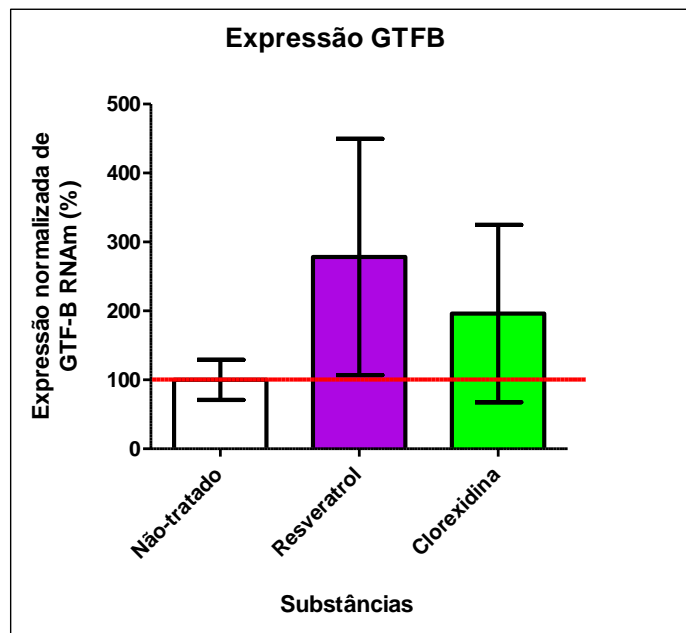


Figura 32. Gráfico da expressão da enzima GTFB após o tratamento com resveratrol e clorexidina. * $P < 0,05$, Teste de Tukey, nível de significância de 95%.

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de GTFB após tratamento com as substâncias avaliadas comparadas ao controle. Embora tenha havido um aumento médio na expressão, tal fato ocorreu devido à grande variação entre os valores obtidos, resultando em alto desvio padrão, como pode ser observado no gráfico. Para confirmar os valores apresentados aqui, é necessária a realização de novo ensaio, com o intuito de diminuir o erro observado.

A expressão de GTFB para o tratamento com a substância xilitol a 100 mg/mL causou diminuição da expressão do gene controle 16S rRNA, sugerindo a redução da viabilidade de *S. mutans* neste ensaio. Tal observação está, no entanto, de acordo com os resultados obtidos no ensaio de MIC. Embora a redução não tenha sido observada para a replicata teste de FTF, o resultado indica que a concentração em estudo pode estar no limite de uma condição tóxica para a bactéria. Deste modo, a análise da expressão de GTFB para o tratamento com xilitol 100 mg/mL foi impossibilitada. Um teste gênico com uma concentração menor de xilitol seria indicado para obtenção de expressão de 16S rRNA normalizado, em uma condição subletal, para a melhor avaliação da expressão de GTFB.

Lee et al. (2009) compararam morfologia da colônia e expressão do gene *gtfB* de *S. mutans* isolados de mulheres após 12 meses de consumo de goma de mascar

de xilitol. Eles descobriram que o *S. mutans* do grupo xilitol formaram colônias menores, menos onduladas, e mais suaves, bem como diminuiu a expressão do gene *gtfB*. Vários estudos têm sugerido que o xilitol reduz a capacidade de adesão de *S. MUTANS* (BIRKHED, 1994; MODESTO e DRAKE, 2006; TANZER, 1995; TRAHAN, 1995; TUOMPO et al., 1983). Através de imagens de microscopia eletrônica de varredura, Badet, Furiga e Thébaud (2008), verificaram que houve inibição do crescimento de biofilme de *S. mutans* e de outras espécies, em discos de hidroxiapatita, após aplicação de xilitol em concentrações que variavam de 1 a 3%. No entanto, estudos sobre o efeito desta substância na virulência e morfologia de *S. mutans* têm sido muito escassos, ou seja, são necessários estudos que verifiquem como o xilitol atua inibindo a formação de biofilme dental.

A curva de crescimento, assim como a expressão de genes relacionados à formação de biofilme de *S. mutans* foram avaliadas por Dong et al. (2012) após tratamento com metade da concentração inibitória mínima (MIC) – concentração inibitória sub-mínima (sub-MIC) – da clorexidina (CHX), do chá de polifenóis e do fluoreto de sódio (NaF), conhecidos agentes anticáries. Um biofilme foi gerado sob um controle de fluxo através do sistema Bioflux para simulação das condições bucais e as mudanças morfológicas foram observadas e analisadas utilizando microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser. Os resultados indicaram que estes três comuns agentes anticáries poderiam aumentar a expressão de genes relacionados à formação de biofilme do *S. mutans*. Foi exibido um denso biofilme com uma ampla matriz extracelular após o tratamento com sub-MICs de NaF e CHX. No entanto, a sub-MIC de chá de polifenóis inibiram a formação de uma matriz extracelular, apesar do aumento da expressão dos genes relacionados à formação de biofilme. Os autores concluíram, portanto, que as sub-MICs destes agentes anticárie favorecem a formação de biofilme de *S. mutans*, os quais podem estimular a progressão de cáries dentárias.

Ban et al. (2009) avaliaram os efeitos inibitórios dos extratos metanólicos da raiz *Polygonum cuspidatum* sobre o desenvolvimento de cáries dentárias, especialmente os relacionados à viabilidade bacteriana e aos fatores indutores de cáries de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Verificaram que a fração acetato de etila, composta principalmente por polidatina, resveratrol, antraglicosídeo e emodina, reduziu significativamente a atividade de GTF de *S. mutans* e *S. sobrinus* em concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, respectivamente. Esta fração também diminuiu a

produção de ácido glicolítico por estas bactérias. Até o momento há poucos estudos que evidenciam a ação do resveratrol sobre biofilmes dentais, sendo necessárias maiores evidências sobre seus mecanismos de ação sobre *S. mutans*.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados laboratoriais obtidos após tratamento com as substâncias testadas, verificou-se que o xilitol, a clorexidina e o resveratrol apresentaram potencial de inibição de biofilme sem a consequente morte bacteriana. No entanto, após realização de qPCR, constatou-se que somente o xilitol inibiu significativamente a expressão da enzima FTF de *S. mutans*. Após a análise estatística da expressão de GTFB foi observado grande desvio padrão, o que indica necessidade de realização de novo ensaio de qPCR para esta enzima. Vale salientar que neste estudo apenas uma concentração foi avaliada, e que a expressão gênica pode variar de acordo com a concentração teste. É interessante notar também que genes distintos podem ser modulados por concentrações distintas de uma mesma substância. Os resultados nos levaram a concluir que as três substâncias (resveratrol, xilitol e clorexidina) atuam como potenciais agentes inibidores de biofilme dentário formado por *S. mutans*. A clorexidina já possui reconhecida ação bactericida, entretanto neste trabalho verificamos uma concentração da mesma em que houve inibição de biofilme sem a consequente morte celular. A inibição do biofilme por estas substâncias seria interessante de modo que não geraríamos um desequilíbrio na flora bacteriana, mantendo portanto bactérias que atuam de forma positiva na cavidade bucal. Diante dos achados podemos propor outras formas de aplicação do xilitol e da clorexidina em odontologia e também a utilização do resveratrol como um agente inibidor do processo carioso, já que o mesmo é capaz de inibir a formação de biofilme dentário. De forma que serão necessários estudos laboratoriais e clínicos para demonstrar a eficácia de tais substâncias para prevenção ou até mesmo tratamento de cáries. Sugere-se o aprofundamento nos estudos de biologia molecular e genética a fim de determinar os mecanismos de ação e o potencial anticárie, assim como a realização de estudos *in vivo* para a confirmação da capacidade preventiva e terapêutica destas substâncias.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005.
- AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1407-1417, 2008.
- AJDIĆ, D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, RUNYING, T.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J. ROE, B. A.; FERRETTI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14434-14439, 2002.
- AL-HASHIMI, I.; LEVINE, M. J. Characterization of in vivo saliva-derived enamel pellicle. **Arch Oral Biol**, v. 34, n. 4, p. 289–295, 1989.
- ALLISON, D. G.; GILBERT, P.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; WILSON, M. **Community structure and co-operation in biofilms**. Cambridge University Press, 2000.
- AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. E. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. **Journal of Food Protection®**, v. 71, n. 7, p. 1510-1525, 2008.
- ARAUJO, M. T. B.; ARAUJO, R. P. C.; CAMPOS, E. J. Estudo in vitro e in vivo da atividade bactericida da clorexidina 0,12 por cento e a 0,2 por cento e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplax. **Rev Odonto Ciênc**, v. 16, n. 33, p. 187-200, 2001
- BADET, C.; FURIGA, A.; THÉBAUD, N. Effect of xylitol on an in vitro model of oral biofilm. **Oral Health Prev Dent**, v. 6, n. 4, p. 337-341, 2008.
- BAHADOR, A.; LESAN, S.; KASHI, N. Effect of xylitol on cariogenic and beneficial oral streptococci: a randomized, double-blind crossover trial. **Iranian journal of microbiology**, v. 4, n. 2, p. 75, 2012.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011.

BANU, L. D.; CONRADS, G.; REHRAUER, H.; HUSSAIN, H.; ALLAN, E., VAN DER PLOEG, J. R. The *Streptococcus mutans* serine/threonine, Kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production and cell wall metabolism. **Infect Immun**, v. 78, n. 5, p. 2209-2220, 2010.

BARATIERI, L. N. **Dentística, procedimentos preventivos e restauradores**. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 1992.

BAVARESCO, L.; FREGONI, C.; CANTU, E.; TREVISAN, M. Stilbene compounds: from the grapevine to wine. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 25, n. 2-3, p. 57-63, 1998.

BECKER, M. R.; PASTER, B. J.; LEYS, E. J.; MOESCHBERGER, M. L.; KENYON, S. G.; GALVIN, J. L., GRIFFEN, A. L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1001-1009, 2002.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 33, n. 4, p. 248-255, 2005.

BELTRÁN-AGUILAR, E. D.; BARKER, L. K.; CANTO, M. T.; DYE, B. A.; GOOCH, B. F.; GRIFFIN, S. O.; HYMAN, J.; JARAMILLO, F.; KINGMAN, A; NOWJACK-RAYMER, R.; SELWITZ, R. H.; WU, T. I. Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis—United States, 1988-1994 and 1999-2002. **MMWR Surveill Summ**, v. 54, n. 3, p. 1-43, 2005.

BERGERON, L. J.; BURNE, R. A. Roles of fructosyltransferase and levanase-sucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism. **Infection and immunity**, v. 69, n. 9, p. 5395-5402, 2001.

BERKOWITZ, R. J. Acquisition and transmission of mutans streptococci. **CDA**, v. 31, n. 2, p. 135-138, 2003.

BHAGWAT, S.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M. USDA database for the flavonoid content of selected foods release 3. **Beltsville: US Department of Agriculture**, 2011.

BIRKHED, D.; ROSELL, K. G.; GRANATH, K. Structure of extracellular water-soluble polysaccharides synthesized from sucrose by oral strains of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. **Archives of oral biology**, v. 24, n. 1, p. 53-61, 1979.

BIRKHED, D. Cariologic aspects of xylitol and its use in chewing gum: a review. **Acta Odontologica**, v. 52, n. 2, p. 116-127, 1994.

- BLANCO, A. R.; SUDANO-ROCCARO, A.; SPOTO, G. C.; NOSTRO, A.; RUSCIANO, D. Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular staphylococcal isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4339-4343, 2005.
- BOWEN, W. H. A vaccine against dental caries. A pilot experiment in monkeys (Macacairus). **British dental journal**, v. 126, n. 4, p. 159, 1969.
- BOWEN, W. H. Vaccine against dental caries -- a personal view. **Journal of dental research**, v. 75, n. 8, p. 1530-1533, 1996.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries research**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.
- BURT, B. A.; EKLUND, S. A.; MORGAN, K. J.; LARKIN, F. E.; GUIRE, K. E.; BROWN, L. O.; WEINTRAUB, J. A. The effects of sugars intake and frequency of ingestion on dental caries increment in a three-year longitudinal study. **Journal of Dental Research**, v. 67, n. 11, p. 1422-1429, 1988.
- BURT, B. A. The use of sorbitol-and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, n. 2, p. 190-196, 2006.
- BURNE, R. A. Oral ecological disasters: the role of short-term extracellular storage polysaccharides. In: **Cariology for the Nineties**. University of Rochester Press Rochester, NY, 1991. p. 351-364.
- BURNE, R. A.; CHEN, Y. Y.; WEXLER, D. L.; KURAMITSU, H.; BOWEN, W. H. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with defects in fructan metabolism assessed in a program-fed specific-pathogen-free rat model. **Journal of dental research**, v. 75, n. 8, p. 1572-1577, 1996.
- BURNE, R. A.; WEN, Z. T.; CHEN, Y. Y.; M.; PENDERS, J. E. Regulation of expression of the fructan hydrolase gene of *Streptococcus mutans* GS-5 by induction and carbon catabolite repression. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 9, p. 2863-2871, 1999.
- BURNET, G. W.; SCHERP, H. W.; SCHUSTER, G. S. **Microbiologia Oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
- BUSUIOC, M.; MACKIEWICZ, K.; BUTTARO, B. A.; PIGGOT, P. J. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7315-7322, 2009.

BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. **Advances in dental research**, v. 11, n. 1, p. 24-32, 1997.

CAI, Y.; KURITA-OCHIAI, T.; HASHIZUME, T.; YAMAMOTO, M. Green tea epigallocatechin-3-gallate attenuates *Porphyromonas gingivalis*-induced atherosclerosis. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 1, p. 76-83, 2013.

CARVALHO, L. E. P. D.; GRANJEIRO, J. M.; BASTOS, J. R. D. M.; HENRIQUES, J. F. C.; TARZIA, O. Clorexidina em Odontologia: Uso do Gluconato de Clorexidina no controle da placa bacteriana. **RGO (Porto Alegre)**, v. 39, n. 6, p. 423-7, 1992.

CAUFIELD, P. W.; GRIFFEN, A. L. Dental caries: an infectious and transmissible disease. **Pediatric Clinics of North America**, v. 47, n. 5, p. 1001-1019, 2000.

CAVEDON, K.; LONDON, J. Adhesin degradation: a possible function for a *Prevotella loescheii* protease? **Oral microbiology and immunology**, v. 8, n. 5, p. 283-287, 1993.

CHAN, M. M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 99-104, 2002.

CHEN, B. Y.; JANES, H. W. (Ed.). **PCR cloning protocols**. Springer Science & Business Media, 2002.

COLBY, S. M.; RUSSELL, R. R. B. Sugar metabolism by mutans streptococci. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. S1, p. 80S-88S, 1997.

CULSHAW, S.; LAROSA, K.; TOLANI, H.; HAN, X.; EASTCOTT, J. W.; SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. Immunogenic and protective potential of mutans streptococcal glucosyltransferase peptide constructs selected by major histocompatibility complex class II allele binding. **Infection and immunity**, v. 75, n. 2, p. 915-923, 2007.

CURY, J. A.; ROCHA, E. P.; KOO, H.; FRANCISCO, S. B.; DEL BEL, C. A. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. **Brazilian dental journal**, v. 11, n. 1, p. 29-34, 1999.

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia restauradora**. São Paulo: Ed. Santos, 2001. p. 33-68.

CURZON, M. E.; PRESTON, A. J. Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. **Caries Research**, v. 38, p. 24-33, 2003.

DECKER E. M.; MAIER, G.; AXMANN, D.; BRECX, M.; VON OHLE, C. Effect of xylitol/chlorhexidine versus xylitol or chlorhexidine as single rinses on initial biofilm

formation of cariogenic streptococci. **Quintessence international (Berlin, Germany: 1985)**, v. 39, n. 1, p. 17-22, 2008.

DOCHERTY, J. J.; FU, M. M.; TSAI, M. Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 243-244, 2001.

DONG, L.; TONG, Z.; LINGHU, D.; LIN, Y.; TAO, R.; LIU, J.; TIAN, Y.; NI, L. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 5, p. 390-395. 2012.

DOYLE, R. J.; CIARDI, J. E. **Glucosyltransferases, glucans, sucrose, and dental caries**. IRL Press, 1983.

ELDERTON, R. J. Clinical studies concerning re-restoration of teeth. **Advances in dental research**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 1990.

ELSALHY, M.; ZAHID, S.; HONKALA, E. Effects of xylitol mouthrinse on *Streptococcus mutans*. **Journal of dentistry**, v. 40, n. 12, p. 1151-1154, 2012.

ETTINGER, R. L. Epidemiology of dental caries. A broad review. **Dental Clinics of North America**, v. 43, n. 4, p. 679-94, vii, 1999.

FEATHERSTONE, J. D.; ADAIR, S. M.; ANDERSON, M. H.; BERKOWITZ, R. J.; BIRD, W. F.; CRALL, J. J.; ROTH, J. R. Caries management by risk assessment: consensus statement. **Journal of the California Dental Association**, v. 31, n. 3, p. 257, 2003.

FEATHERSTONE, J. D. B. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. suppl 1, p. C39-C42, 2004.

FEJERSKOV, O; KIDD, E. A. M., eds. **Dental caries: the disease and its clinical management**. Copenhagen, Denmark. Blackwell Monksgaard, 2003.

FILOCHE, S.; WONG, L.; SISSONS, C. H. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. **Journal of dental research**, v. 89, n. 1, p. 8-18, 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FRAGA, C. P. T.; MAYER, M. P. A.; RODRIGUES, C. R. M. D. Use of chewing gum containing 15% of xylitol and reduction in mutans streptococci salivary levels. **Brazilian oral research**, v. 24, n. 2, p. 142-146, 2010.

FREMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

FUKUSHIMA, K.; OKADA, T.; OCHIAI, K. Production, characterization, and application of monoclonal antibodies which distinguish three glucosyltransferases from *Streptococcus mutans*. **Infection and immunity**, v. 61, n. 1, p. 323-328, 1993.

GROSS, E. L.; BEALL, C. J.; KUTSCH, S. R.; FIRESTONE, N. D.; LEYS, E. J.; GRIFFEN, A. L. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47722, 2012.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 299-302, 2001.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HENNESSEY, T. D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **Journal of Periodontal Research**, v. 8, n. s12, p. 61-67, 1973.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio/Technology**, n. 11, p. 1026-30, 1993.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K.; OTAKE, S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. **Caries Res**, v. 40, p. 265-270, 2006.

HORTENSE, S. R.; CARVALHO, É. D. S.; CARVALHO, F. S. D.; SILVA, R. P. R. D.; BASTOS, J. R. D. M.; BASTOS, R. D. S. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. **Rev. odontol. Univ. Cid. São Paulo (Online)**, v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.

HU, Z. Q.; ZHAO, W. H.; YODA, Y.; ASANO, N.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Additive, indifferent and antagonistic effects in combinations of epigallocatechin gallate with 12 non- β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1051-1054, 2002.

HUBER, B.; EBERL, L.; FEUCHT, W.; POLSTER, J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. **ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C**, v. 58, n. 11/12, p. 879-884, 2003.

HWANG, J. Y.; CHOI, S. C.; PARK, J. H.; KANG, S. W. The use of green tea extract as a storage medium for the avulsed tooth. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 7, p. 962-967, 2011.

JAMELLI, S. R.; MENDONÇA, M. C.; DINIZ, M. D. G.; ANDRADE, F. B. M. D.; MELO, J. F. D.; FERREIRA, S. R.; SILVA, P. V. Saúde bucal e percepção sobre o atendimento odontológico em pacientes com transtorno psíquico moradores de residências terapêuticas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1795-1800, 2010.

JAWETZ, M. A.; BROOKS, G. F.; BULEL, J. S. **Microbiologia Médica**. 21ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

JENABIAN, N.; MOGHADAMNIA, A. A.; KARAMI, E. The effect of *Camellia Sinensis* (green tea) mouthwash on plaque-induced gingivitis: a single-blinded randomized controlled clinical trial. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2012.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Streptococcal adhesion and colonization. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, n. 2, p. 175-200, 1997.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 12, p. 589-595, 2005.

JUNG, I. H.; YUN, J. H.; CHO, A. R.; KIM, C. S.; CHUNG, W. G.; CHOI, S. H. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on maintaining the periodontal ligament cell viability of avulsed teeth: a preliminary study. **Journal of periodontal & implant science**, v. 41, n. 1, p. 10-16, 2011.

JUNG, I. H.; LEE, D. E.; YUN, J. H.; CHO, A. R.; KIM, C. S.; YOU, Y. J.; CHOI, S. H. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. **Journal of periodontal & implant science**, v. 42, n. 6, p. 185-195, 2012.

KEYES, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: Findings and implications. **Archives of oral biology**, v. 1, n. 4, p. 304-IN4, 1960.

KIDD, E. A.; GIEDRYS-LEEPER, E.; SIMONS, D. Take two dentists: a tale of root caries. **Dental update**, v. 27, n. 5, p. 222, 2000.

KIDD, E. A. M.; JOYSTON-BECHAL, S. Essentials of dental caries: The disease and its management. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1997.

KLEINBERG, J. A. A mixed bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, p. 108-125, 2002.

- KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J.; RICKARD, A. H.; JAKUBOVICS, N. S.; CHALMERS, N. I.; DIAZ, P. I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology** 2000, v. 42, n. 1, p. 47-79, 2006.
- KOO, H.; NINO DE GUZMAN, P.; SCHOBEL, B. D.; VACCA SMITH, A. V.; BOWEN, W. H. Influence of cranberry juice on glucan-mediated processes involved in *Streptococcus mutans* biofilm development. **Caries research**, v. 40, n. 1, p. 20-27, 2005.
- KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M. I.; JEON, J. G. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3024-3032, 2010.
- KRAFT, T. E.; PARISOTTO, D.; SCHEMPP, C., EFFERTH, T. Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 49, n. 9, p. 782-799, 2009.
- KROL, D. M. Dental caries, oral health, and pediatricians. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 33, n. 8, p. 253-270, 2003.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJOÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.
- KURAMITSU, H. K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 4, n. 2, p. 159-176, 1993.
- KURAMITSU, H. K.; ELLEN, R. P. **Oral bacterial ecology: the molecular basis**. Horizon Scientific Press, 2000.
- KURAMITSU, H. K.; HE, X.; LUX, R.; ANDERSON, M. H.; SHI, W. Interspecies interactions within oral microbial communities. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 4, p. 653-670, 2007.
- LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity. **Oral bacterial ecology: the molecular basis**, p. 131-168, 2000. In:
- LEE, S. F.; LI, Y. H.; BOWDEN, G. H. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. **Infection and immunity**, v. 64, n. 3, p. 1035-1038, 1996.
- LEE, K. M.; KIM W. S.; LIM J.; NAM, S.; YOUN, M.; NAM S. W.; KIM, Y.; KIM, S. H.; PARK, W.; PARK, S. Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against

enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Food Protection®**, v. 72, n. 2, p. 325-331, 2009.

LEE, S. H.; CHOI, B. K.; KIM, Y. J. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. **Archives of oral biology**, v. 57, n. 6, p. 697-703, 2012.

LILJEMARK, W. F.; BLOOMQUIST, C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 7, n. 2, p. 180-198, 1996.

LIMA, L. H. A.; BERLINCK, C. N. Xilitol, o adoçante do futuro. **Ciência Hoje**, v. 33, p. 66-69, 2003.

LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **Rev. dent. press ortodon. ortopedi. facial**, v. 12, n. 6, p. 119-130, 2007.

LIU, J.; LING, J. Q.; ZHANG, K.; HUO, L. J.; NING, Y. Effect of sodium fluoride, ampicillin, and chlorhexidine on *Streptococcus mutans* biofilm detachment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4532-4535, 2012.

LOMBARDO BEDRAN, T. B. L.; AZELMAT, J.; SPOLIDORIO, D. P.; GRENIER, D. Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells. **BioMed research international**, v. 2013.

LORENZ, M.; URBAN, J.; ENGELHARDT, U.; BAUMANN, G.; STANGL, K.; STANGL, V. Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilatation: New insights into tea ingredients involved. **Basic research in cardiology**, v. 104, n. 1, p. 100-110, 2009.

LOTUFO, R. F. M.; SOLIS, A. C. O.; PANNUTI, C. M. Bases racionais para indicação de antimicrobianos locais e sistêmicos em Periodontia. **Atualização clínica em odontologia. São Paulo: Artes Médicas**, v. 6, p. 381-393, 2005.

LY, K. A.; MILGROM, P.; ROBERTS, M. C.; YAMAGUCHI, D. K.; ROTHEN, M.; MUELLER, G. Linear response of mutans streptococci to increasing frequency of xylitol chewing gum use: a randomized controlled trial. **BMC Oral Health**, v. 6, n. 1, p. 6, 2006.

MACKAY, I. M. (Ed.). Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. **Horizon Scientific Press**, 2007.

MAGALHAES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; HANNAS, A.; ATTIN, T.; BUZALAF, M. A. R. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. **Journal of dentistry**, v. 37, n. 12, p. 994-998, 2009.

- MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. **The American journal of gastroenterology**, v. 95, n. 7, p. 1849, 2000.
- MALTZ, M.; SILVA, B. B. Relação entre cárie, gengivite e fluorose e nível socioeconômico em escolares. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 170-176, 2001.
- MANJI, F.; FEJERSKOV, O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. **Journal of dental research**, v. 69, n. 2 suppl, p. 733-741, 1990.
- MANKOVSKAIA, A.; LEVESQUE, C. M.; PRAKKI, A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 2, p. 203-207, 2013.
- MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 279-294, 2003.
- MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries research**, v. 38, n. 3, p. 204-211, 2004.
- MARSH, P. D. Dental Plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. **J Clin Periodontol**, v. 32, p. 07-15, 2005.
- MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and microbial community—implications for health and disease. **BMC Oral health**, v. 6, n. Suppl 1, p. S14, 2006.
- MARSH, P. D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of dentistry**, v. 38, p. S11-S15, 2010.
- MARTTINEN, A. M.; RUAS-MADIEDO, P.; HIDALGO-CANTABRANA, C.; SAARI, M. A.; IHALIN, R. A.; SÖDERLING, E. M. Effects of xylitol on xylitol-sensitive versus xylitol-resistant *Streptococcus mutans* strains in a three-species in vitro biofilm. **Current microbiology**, v. 65, n. 3, p. 237-243, 2012.
- MARUYAMA, T.; TOMOFUJI, T.; ENDO, Y.; IRIE, K.; AZUMA, T.; EKUNI, D.; MORITA, M. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 1, p. 48-53, 2011.
- MATSUMURA, M.; IZUMI, T.; MATSUMOTO, M.; TSUJI, M.; FUJIWARA, T.; OOSHIMA, T. The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Immun**, v. 7, p. 213-215, 2003.
- MCFARLAND, L. V. Normal flora: diversity and functions. **Microbial ecology in health and disease**, v. 12, n. 4, p. 193-207, 2000.

MENAKER, L. Cáries dentárias: bases biológicas. In: **Cáries dentárias: bases biológicas**. Guanabara Koogan, 1984.

MILGROM, P.; LY, K. A.; ROBERTS, M. C.; ROTHEN, M.; MUELLER, G.; YAMAGUCHI, D. K. Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum. **Journal of dental research**, v. 85, n. 2, p. 177-181, 2006.

MILGROM, P.; LY, K. A.; ROTHEN, M. Xylitol and its vehicles for public health needs. **Advances in dental research**, v. 21, n. 1, p. 44-47, 2009.

MIRANDA, J. L.; DE SOUZA ANDRADE, E. 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.

MJOR, I. A.; TOFFENETTI, F. Secondary caries: a literature review with case reports. **Quintessence International-English Edition**, v. 31, n. 3, p. 165-180, 2000.

MODESTO, A.; DRAKE, D. R. Multiple exposures to chlorhexidine and xylitol: adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Current microbiology**, v. 52, n. 6, p. 418-423, 2006.

MOSS, S. J. Xylitol—an evaluation. **Int Dental J**, v. 49, p. 00-00, 1999.

MUNSON, M. A.; BANERJEE, A.; WATSON, T. F.; WADE, W. G. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3023-3029, 2004.

NEWBRUN, E. Cariology. **WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD(USA). 1983.**

NYVAD, B.; CRIELAARD, W.; MIRA, A. TAKAHASHI, N.; BEIGHTON, D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. **Caries Res**, v. 47, n. 2, p. 89-102, 2013.

ÖHRN, K.; SANZ, M. Prevention and therapeutic approaches to gingival inflammation. **Journal of clinical periodontology**, v. 36, n. s10, p. 20-26, 2009.

OLIVEIRA, A. R. R. Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real. Tese de mestrado, Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências. Lisboa, 2009.

OWENS, J.; ADDY, M.; FAULKNER, J.; LOCKWOOD, C.; ADAIR, R. A short-term clinical study design to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinses when used as adjuncts to toothpastes: applied to

chlorhexidine. **Journal of clinical periodontology**, v. 24, n. 10, p. 732-737, 1997.

PABST, M. J.; CISAR, J. O.; TRUMMEL, C. L. The cell wall-associated levansucrase of *Actinomyces viscosus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 566, n. 2, p. 274-282, 1979.

PALOMBO, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 100, 2009.

PASTER, B. J.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L.; ERICSON, R. E.; LAU, C. N.; LEVANOS, V. A.; DEWHIRST, F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3770-3783, 2001.

PASTER, B. J.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; DEWHIRST, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontology** **2000**, v. 42, n. 1, p. 80-87, 2006.

PETERSEN, P. E.; YAMAMOTO, T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 33, n. 2, p. 81-92, 2005.

PETERSON, S. N.; SNESRUD, E.; SCHORK, N. J.; BRETZ, W. A. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. **International Dental Journal**, v. 61, n. s1, p. 11-22, 2011.

PITTS, N. B.; STAMM, J. W. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)—final consensus statements: agreeing where the evidence leads. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. suppl 1, p. C125-C128, 2004.

PRABHAKAR, J.; SENTHILKUMAR, M.; PRIYA, M. S.; MAHALAKSHMI, K.; SEHGAL, P. K.; SUKUMARAN, V. G. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 83-86, 2010.

PRATTEN, J.; BARNETT, P.; WILSON, M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3515-3519, 1998.

PREZA, D.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; WILLUMSEN, T.; GRINDE, B.; PASTER, B. J. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2015-2021, 2008.

- RAMOS-GOMEZ, F.; WEINTRAUB, J.; GANSKY, S.; HOOVER, C.; FEATHERSTONE, J. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 26, n. 2, p. 165-173, 2003.
- ROCCARO, A. S.; BLANCO, A. R.; GIULIANO, F.; RUSCIANO, D.; ENEA, V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1968-1973, 2004.
- RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **European Journal of Oral Sciences**, v. 97, n. 2, p. 115-119, 1989.
- ROZEN, R.; BACHRACH, G.; BRONSHTEYN, M.; GEDALIA, I.; STEINBERG, D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, n. 2, p. 205-210, 2001.
- RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento-Edição nº**, v. 33, p. 35, 2004.
- RUSSELL, R. R. B.; DONALD, A. C.; DOUGLAS, C. W. I. Fructosyltransferase activity of a glucan-binding protein from *Streptococcus mutans*. **Journal of general microbiology**, v. 129, n. 10, p. 3243-3250, 1983.
- RUSSELL, R. R. B. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. **Caries research**, v. 28, n. 2, p. 69-82, 1994.
- SAKANAKA, S.; KIM, M.; TANIGUCHI, M.; YAMAMOTO, T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 2307-2311, 1989.
- SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51-59, 2007.
- SEOW, W. K. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 26, n. S1, p. 8-27, 1998.
- SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Development**, v. 15, n. 12, p. 1468-1480, 2001.
- SCHUBERT, R.; FISCHER, R.; HAIN, R.; SCHREIER, P. H.; BAHNWEG, G.; ERNST, D.; SANDERMANN JR, H. An ozone-responsive region of the grapevine

resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. **Plant molecular biology**, v. 34, n. 3, p. 417-426, 1997.

SHEIHAM, A. Dietary effects on dental diseases. **Public health nutrition**, v. 4, n. 2b, p. 569-591, 2001.

SHEMESH, M.; TAM, A.; FELDMAN, M.; STEINBERG, D. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* ftf, gtf and vicR genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. **Carbohydrate research**, v. 341, n. 12, p. 2090-2097, 2006.

SHEN, S.; SAMARNAYAKE, L. P.; YIP, H. K. *In vitro* growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. **J Dent**, v. 37, p. 667-678, 2004.

SHIMAMURA, T.; ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an antiinfective agent. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)**, v. 6, n. 1, p. 57-62, 2007.

SHIROZA, T.; KURAMITSU, H. K. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 810-816, 1988.

SHIROZA, T.; KURAMITSU, H. K. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 810-816, 1988.

SMITH, D. J. Dental Caries Vaccines: Prospects and Concerns. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 4, p. 335-349, 2002.

SMITH, D. J.; KING, W. F.; RIVERO, J.; TAUBMAN, M. A. Immunological and protective effects of diepitopic subunit dental caries vaccines. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 2797-2804, 2005.

SOCRANSKY, S. S.; DZINK, J. L.; SMITH, C. M. Chemically defined medium for oral microorganisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, n. 2, p. 303-305, 1985.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental Biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology**, v. 28, p. 12-55, 2002.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v. 38, n. 1, p. 135-187, 2005.

SÖDERLING, E. M.; EKMAN, T. C.; TAIPALE, T. J. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* with low xylitol concentrations. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 382-385, 2008.

SÖDERLING, E. M. Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque. **Advances in dental research**, v. 21, n. 1, p. 74-78, 2009.

SÖDERLING, E. M.; HIETALA-LENKKERI, A. Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. **Current microbiology**, v. 60, n. 1, p. 25-29, 2010.

SREEBNY, L. M. Sugar and human dental caries. **World review of nutrition and dietetics**, v. 40, p. 19, 1982.

SREENIVASAN, P.; GAFFAR, A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 11, p. 965-974, 2002.

STEINBERG, D.; BACHRACH, G.; GEDALIA, I.; ABU-ATA, S.; ROZEN, R. Effects of various antiplaque agents on fructosyltransferase activity in solution and immobilized onto hydroxyapatite. **European journal of oral sciences**, v. 110, n. 5, p. 374-379, 2002.

SUBRAMANIAM, P.; ESWARA, U.; REDDY, K. M. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: An in vitro study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 23, n. 1, p. 43, 2012.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 3, p. 294-303, 2011.

TAM, A.; SHEMESH, M.; WORMSER, U., SINTOV, A.; STEINBERG, D. Effect of different iodine formulations on the expression and activity of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase and fructosyltransferase in biofilm and planktonic environments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, n. 5, p. 865–871. 2006.

TANZER, J. M. Xylitol chewing gum and dental caries. **International dental journal**, v. 45, n. 1 Suppl 1, p. 65-76, 1995.

THOMSON, W. M. Dental caries experience in older people over time: what can the large cohort studies tell us? **British dental journal**, v. 196, n. 2, p. 89-92, 2004.

TINANOFF, N.; KANELLIS, M. J.; VARGAS, C. M. Current understanding of the epidemiology, mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. **Pediatric dentistry**, v. 24, n. 6, p. 543-551, 2002.

TORRES, M. C. M. B. Utilização da clorexidina em seus diversos veículos. **Rev. bras. odontol**, v. 57, n. 3, p. 174-80, 2000.

TOUGER-DECKER, R.; VAN LOVEREN, C. Sugars and dental caries. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 4, p. 881S-892S, 2003.

TRAHAN, L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque--its clinical significance. **International dental journal**, v. 45, n. 1 Suppl 1, p. 77-92, 1995.

TUOMPO, H.; MEURMAN, J. H.; LOUNATMAA, K.; LINKOLA, J. Effect of xylitol and other carbon sources on the cell wall of *Streptococcus mutans*. **European Journal of Oral Sciences**, v. 91, n. 1, p. 17-25, 1983.

TWETMAN, S. Consistent evidence to support the use of xylitol-and sorbitol-containing chewing gum to prevent dental caries. **Evidence-based dentistry**, v. 10, n. 1, p. 10-11, 2009.

VACCA-SMITH, A. M.; SCOTT-ANNE, K. M.; WHELEHAN, M. T.; BERKOWITZ, R. J.; FENG, C.; BOWEN, W. H. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. **Caries research**, v. 41, n. 6, p. 445, 2007.

VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Springer Science & Business Media, 2008.

WHITE, B. A. (Ed.). **PCR protocols: current methods and applications**. Springer Science & Business Media, 1993.

WIATER, A.; CHOMA, A.; SZCZODRAK, J. Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study. **Journal of basic microbiology**, v. 39, n. 4, p. 265-273, 1999.

WINN, D. M. Tobacco use and oral disease. **Journal of dental education**, v. 65, n. 4, p. 306-312, 2001.

WU, C. D.; WEI, G. Tea as a functional food for oral health. **Food constituents and oral health: current status and future prospects**, p. 396-417, 2009.

WU, J. M.; WANG, Z. R.; HSIEH, T. C.; BRUDER, J. L.; ZOU, J. G.; HUANG, Y. Z. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 8, n. 1, p. 3-17, 2001.

XU, X.; ZHOU, X. D.; WU, C. D. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1229-1236, 2011.

XU, X.; ZHOU, X. D.; WU, C. D. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. **Archives of oral biology**, v. 57, n. 6, p. 678-683, 2012.

YODA, Y.; HU, Z. Q.; ZHAO, W. H.; SHIMAMURA, T. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 1, p. 55-58, 2004.

ZANATTA, F. B.; ANTONIAZZI, R. P.; RÖSING, C. K. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 11, p. 2127-2134, 2007.

ZHAO, W. H.; ASANO, N.; HU, Z. Q.; SHIMAMURA, T. Restoration of antibacterial activity of β -lactams by epigallocatechin gallate against β -lactamase-producing species depending on location of β -lactamase. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 735-740, 2003.