



RENORBIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

***Streptococcus mutans* e cárie dentária: estudos sobre
a perspectiva de identificação de pacientes de risco à
cárie e potencial da clorexidina como agente
antimicrobiano bucal**

Andréa Cristina Barbosa da Silva

João Pessoa – PB

2010

RENORBIO

Andréa Cristina Barbosa da Silva

2010

RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Andréa Cristina Barbosa da Silva

***Streptococcus mutans* e cárie dentária: estudos sobre a perspectiva de identificação de pacientes de risco à cárie e potencial da clorexidina como agente antimicrobiano bucal**

Tese em formato de artigo científico, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da RENORBIO, ponto focal Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

João Pessoa, PB

S586s Silva, Andréa Cristina Barbosa da.
Streptococcus mutans e cárie dentária: estudos sobre a perspectiva de identificação de pacientes de risco à cárie e potencial da clorexidina como agente antimicrobiano bucal / Andréa Cristina Barbosa da Silva.- João Pessoa, 2010.
92f. : il.
Orientador: Demétrius Antonio Machado de Araújo
Co-orientador: Fábio Correia Sampaio
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN
1.Biotecnologia – Saúde. 2.Especialidades odontológicas.
3.Degluconato de clorexidina. 4.Microscopia Eletrônica de Varredura. 5.Biofilme dental. 6.Meio ambiente plantônico.

UFPB/BC

CDU: 60:614(043)

Andréa Cristina Barbosa da Silva

***Streptococcus mutans* e cárie dentária: estudos sobre a perspectiva de
identificação de pacientes de risco à cárie e potencial da clorexidina
como agente antimicrobiano bucal**

DATA DA DEFESA: 21 DE DEZEMBRO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^o. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo (UFPB/RENORBIO)
Orientador

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio (UFPB/RENORBIO)
Co-orientador

Prof.^a. Dr.^a. Márcia Regina Piuvezam (UFPB)
Examinadora

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (UFPB)
Examinador

Prof. Dr. Marcos Antônio Almeida Medeiros (UNIPB)
Examinador

Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich (USP)
Examinador

A Deus, por sua presença constante em minha vida;

À minha amada mãe, Joanita, por sempre ter me apoiado, por sua
paciência, compreensão e exemplo de vida;

Aos meus queridos irmãos, Walter André e Jorge Luiz, pelo
companheirismo e amizade durante o meu árduo caminhar científico.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Demetrius Antônio Machado de Araújo e Fábio Correia Sampaio, pela orientação sempre presente, pelos desafios confiados a mim, pelo exemplo de competência e ética profissional, e acima de tudo, pela amizade dedicada. É uma honra fazer parte deste grupo de pesquisa inovador.

À Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos-Graner, pela co-orientação, apoio e amizade dispensados durante o estágio-sanduíche na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), UNICAMP;

Ao Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp, pelos conhecimentos transmitidos durante a confecção, análise e discussão dos dados da pesquisa e por sua amizade nos pouquíssimos momentos de lazer da minha estada em Piracicaba;

Aos Profs. Drs. Valdir de Andrade Braga, Silvana Cristina dos Santos e José Pinto de Siqueira Júnior pelas valiosas discussões durante a qualificação desta tese de doutorado;

Aos meus amigos pessoenses doutores Marcos Medeiros, Fabrícia Montenegro e futura doutora Micheline Donato, pela amizade, estímulo, momentos de descontração, e todo o apoio em João Pessoa, na fase em que morei na cidade e também longe dela;

Às técnicas e pesquisadoras Gláucia Faheina e Tereza Cristina Grisi, dos Laboratórios de Biologia Molecular e Ecologia (LABIMES I e II) do Departamento de Biologia Molecular da UFPB, pelos ensinamentos laboratoriais e amizade durante o doutorado;

Aos pesquisadores do Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL), em especial à Fabíola Galbiatti, por seu valioso auxílio durante a primeira etapa da pesquisa, discussões científicas, afeto e atenção;

Aos colegas do Grupo Biomolcanais pela troca de conhecimentos em nossos encontros semanais de discussão de pesquisa, pelo apoio científico e companheirismo;

Aos amigos e técnicos do Laboratório de Microbiologia da FOP, UNICAMP, pela amizade e momentos de descontração durante meu estágio por lá;

Aos Departamentos de Biologia Molecular e de Clínica e Odontologia Social da UFPB, e de Diagnóstico Oral da FOP, UNICAMP, agradeço a disponibilidade das pessoas que o fazem e dos laboratórios, durante a fase de desenvolvimento deste estudo;

À CAPES, pela concessão da bolsa durante a realização desta pesquisa;

A todos que, direta ou indiretamente, participaram da realização deste trabalho.

“O essencial é invisível aos olhos”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Streptococcus mutans é o principal agente etiológico da cárie dentária, especialmente devido à sua habilidade de adesão à superfície dentária. Esta bactéria produz glicosiltransferases, que sintetizam polímeros de glicano solúveis e insolúveis a partir da sacarose, que aumentam a colonização de bactérias cariogênicas e promovem a formação de biofilme dental na superfície dos dentes. A clorexidina é o antimicrobiano tópico mais utilizado na Odontologia, sendo considerado padrão nas diversas especialidades odontológicas, porém existem poucos estudos com esta droga em nível molecular. O objetivo do presente estudo foi investigar a atividade do gluconato de clorexidina em *Streptococcus mutans* UA159, plantônicos e organizados em biofilme, em diferentes concentrações e períodos de crescimento. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBC) da clorexidina nas células plantônicas e MBC em biofilmes, foram determinadas pelo método da microdiluição. O RNA total das *S. mutans* plantônicos e organizados em biofilme, expostos ou não (controles) à clorexidina foram extraídos, purificados e reversamente transcritos a Cdna. O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para quantificar os níveis relativos de transcrição dos genes *16S rRNA*, *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* de *S. mutans* na presença ou ausência de clorexidina. A atividade da clorexidina na estrutura do biofilme inicial de 2 e 4h, e as alterações morfológicas nas células plantônicas, sobre concentrações variadas, foi examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A MIC e a MBC para células plantônicas foram 2,2 mg/L e 18 mg/L, respectivamente, e a MBC para os biofilmes foi de 800 mg/L. A exposição à clorexidina, nas concentrações de 4,5 mg/L e 9 mg/L, reduziu a contagem das células plantônicas por 6 e 20 vezes, respectivamente, enquanto a contagem das células do biofilme foram reduzidas (2,5 vezes ou mais) em concentrações acima de 500 mg/L. Nas células plantônicas, a exposição a 4,5 mg/L de CHX, aumentou a expressão das *gtfC* e *gtfD* por 11 e 4 vezes ($p < 0.01$), respectivamente. Em biofilme, a expressão das *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* foram reduzidas ($< 1,6$ x, $p < 0.01$) em concentrações acima de 500 mg/L. As superfícies celulares aparentemente não mostraram modificação quando as células plantônicas foram expostas às concentrações de 4,5 mg/L por 2 ou 4h, mas depois de 6h, várias células murchas de *S. mutans* com material intracelular extravasado, foram observadas. Um decréscimo no comprimento das cadeias das células e também da matriz foram encontradas quando os biofilmes iniciais foram expostos a 1,1 mg/L e 4,5 mg/L de clorexidina, enquanto as concentrações de 1200 mg/L e 2000 mg/L causaram extensa precipitação de material desconhecido nas lamínulas. Assim, concluiu-se que os efeitos da clorexidina contra *S. mutans* dependem do tipo de organização celular, período de crescimento e concentração utilizada da droga. A clorexidina pode afetar a parede celular e interferir com mecanismos de formação do biofilme e, em concentrações subletais, reduz a expressão de algumas *gtfs*, o que pode exercer um efeito anticariogênico.

Palavras-chave: Digluconato de clorexidina, meio ambiente plantônico, biofilme dental, PCR em tempo real, Microscopia Eletrônica de Varredura.

ABSTRACT

Streptococcus mutans is the main etiologic agent of dental caries, especially due to its ability to adhere to the tooth surface. This bacterium produces glycosyltransferases that synthesize polymers of soluble and insoluble glucan from sucrose, which increases the colonization of cariogenic bacteria and promotes the formation of biofilm on the surface of the teeth. Chlorhexidine is the most frequent topical antibiotic used in dentistry and is considered standard in the various dental specialties, but there are few studies on this drug at the molecular level. The aim of the present study was to investigate the antibacterial activity of chlorhexidine gluconate against *in vitro* planktonic and biofilm *Streptococcus mutans* cells in a dose- and time-dependent manner. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of chlorhexidine in planktonic cells and MBC in biofilms were determined by microdilution method. Total *S. mutans* RNA from either planktonic cells or biofilms exposed or non-exposed (controls) to chlorhexidine were extracted, purified and reversely transcribed to cDNA. Real-time reverse transcription-PCR was used to quantify the relative levels of *16S rRNA*, *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* transcription of *S. mutans* in the presence of CHX. The activity of CHX in the initial biofilm structure for 2 and 4 h and morphological alterations in planktonic cells, under a range of CHX concentrations, was examined by Scanning Electron Microscopy (SEM). CLX MIC and MBC for planktonic cells were 2.2 mg/L and 18 mg/L, respectively, while MBC for biofilm was 800 mg/L. Planktonic cells exposed to CLX 4.5 mg/L and 9 mg/L were reduced almost by 6- and 20-fold, whereas biofilm counts were reduced (2.5-fold or more) in concentrations above 500 mg/L. In planktonic cells, exposition to CHX 4.5 mg/L increased *gtfC* and *gtfD* expression by 11-fold and 4-fold ($p < 0.01$), respectively. In biofilm, expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* were reduced (< 1.6 -fold $p < 0.01$) at concentrations above 500 mg/L. Cell surfaces did not show any change when planktonic cells were exposed to CHX at 4.5 mg/L for 2 or 4 h, but after 6 h, several wilted *S. mutans* cells with lost intracellular material could be observed. A decrease in the cells' chain length and matrix was found when the initial biofilm was exposed from 1.1 mg/L to 4.5 mg/L of CHX, while 1200 mg/L and 2000 mg/L caused extensive precipitation of unknown material on the slide. Thus, we conclude that the CHX effects against bacteria depend on the kind of growth organization and the concentration/time of exposure to the drug. CHX may affect cell walls and intervene with mechanisms of the biofilm formation, and at sub-lethal concentrations, affect the expression of *gtfs*, which may exert an anticariogenic effect.

Key words: chlorhexidine gluconate, planktonic environment, biofilm; real-time PCR; scanning electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ilustração esquemática da relação entre os fatores etiológicos (círculos azuis), determinantes (círculo rosa) e relacionados (círculo amarelo) com a iniciação e desenvolvimento da cárie dentária..... 20**
- Figura 2: Reconstrução de vias metabólicas específicas e mecanismos de transporte em *S. mutans*..... 31**
- Figura 3: Reações catalisadas por glicanosacarases..... 33**
- Figura 4: Estrutura gênica esquemática das glicosiltransferases..... 33**
- Figura 5: Fórmulas da clorexidina: não protonada (A) e protonada (B)..... 35**

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

® - Marca registrada

% - Porcentagem

16S rRNA – Gene 16S RNA ribossomal

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

ATPase – Enzima ATPase

BHI – Brain Heart Infusion Broth

bp – Pares de Base

Cal - Calorias

°C – Graus Celsius

C1, C1, C3 e C4: Concentrações 1, 2, 3 e 4

cDNA – DNA complementar

CEB – Contagem de Estreptococos Bucais

ceo-d – Dentes decíduos Cariados, Extração indicada e Obturados

CHX – Clorexidina

CFU – Colony-Forming Unit

CO₂ – Gás carbônico

CPO-D – Dentes permanentes Cariados, Perdidos e Obturados

Ct – Cycle threshold

Des - Desmineralização

DNA – Ácido Dextroribonucleico

DP - Desvio Padrão

F - Fluoreto

g – Gramas

GBI – Gingival Bleeding Index

gtf – Gene da glicosiltransferase

gtfB – Gene da glicosiltransferase B

gtfC – Gene da glicosiltransferase C

gtfD – Gene da glicosiltransferase D

gtfBC – Gene da glicosiltransferase B e C

GtfB – Enzima glicosiltransferase-I

GtfC – Enzima glicosiltransferase-SI

GtfD – Enzima glicosiltransferase-S

Gtf ou GTF – Enzima glicosiltransferase

h – hora

HCA – High Caries Activity

HAP - Hidroxiapatita

HCl – Ácido Clorídrico

H₂O - Água

IHOS – Índice de Higiene Oral Simplificado

ISG – Índice de Sangramento Gengival

K – Potássio

kV – Quilovolt

KSP_{HAP} – Produto de solubilidade da hidroxiapatita

M – Molar

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

MBC – Minimum Bactericidal Concentration

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

mL - Mililitros

mm – Milímetros

mmol - Milimolar

mM – Milimolar

µg - Microgramas

µl - Microlitro

μm - Micrometro

MS – Ágar Mitis salivarius

MSA – Ágar Mitis salivarius

nM – Nanomolar

nm - Nanômetro

ng – Nanograma

ns – not statistical difference

O₂ – Oxigênio molecular

OHI-S – Simplified Oral Hygiene Index

OSC – Oral Streptococci Counting

PAI_{HAP} – Produto de atividade iônica com respeito à hidroxiapatita

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

Plk - Plantônico

pMol – Picomol

Re - Remineralização

RNA – Ácido Ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido Ribonucléico ribossômico

RT-PCR – Real-time quantitative PCR

s – Segundo

SEM – Scanning Electron Microscopy

S. gordonii – *Streptococcus gordonii*

S. mutans – *Streptococcus mutans*

S. oralis – *Streptococcus oralis*

S. salivarius – *Streptococcus salivarius*

S. sanguinis – *Streptococcus sanguinis*

S. sobrinus – *Streptococcus sobrinus*

S. thermophilus – *Streptococcus thermophilus*

S. vestibularis – *Streptococcus vestibularis*

TE – Tampão Tris-EDTA

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	CÁRIE DENTÁRIA: ASPECTOS GERAIS	19
2.2	RISCO DE CÁRIE	23
2.3	BIOFILME DENTAL	25
2.4	ESTREPTOCOCOS BUCAIS E SUA RELAÇÃO COM A CÁRIE DENTÁRIA.....	27
2.4.1	<i>Streptococcus mutans</i>	29
2.5	GLICOSILTRANSFERASES.....	30
2.6	CLOREXIDINA.....	34
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
	REFERÊNCIAS	40
	ARTIGO 1.....	55
	ARTIGO 2.....	59
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada uma doença transmissível e infecciosa, onde os micro-organismos possuem um importante papel na sua etiologia, sendo o *Streptococcus mutans* o micro-organismo mais associado à doença, principalmente como resultado de sua habilidade para aderir às superfícies dos dentes e à sua acidogenicidade (LOESCHE, 1986). Os *S. mutans* produzem três glicosiltransferases (GTFs), GTFB, GTFC e GTFD, as quais sintetizam polímeros de glucano a partir da sacarose (KURAMITSU, 1993; MONCHOIS et al., 1999), que aumentam a colonização de bactérias cariogênicas e promovem a formação de biofilme dental na superfície dos dentes (HAMADA e SLADE, 1980).

Alguns agentes antimicrobianos são utilizados como auxiliares no controle da formação do biofilme dental, com o objetivo de mantê-lo em nível de menor patogenia, por meio da redução do biofilme existente, o que por si só já previne a formação de um novo biofilme, ou por inibição seletiva de bactérias associadas à doença cárie, bem como a redução da expressão de determinantes de virulência (MARSH, 1992).

Dentre estas substâncias, a clorexidina (CHX), uma bisbiguanida catiônica sintética, é o agente tópico mais eficaz na redução do biofilme dental (CUNHA, 2000; CORREIA, 1998; REED et al., 1977). Esta substância se liga a superfícies carregadas negativamente, possuindo um amplo espectro de atividade antimicrobiana (SALEM et al., 1987). Porém, sua aplicação clínica é limitada porque possui um sabor amargo e pode causar pigmentação nos dentes quando utilizada frequentemente (WEI et al., 2006).

Em concentrações elevadas, esta substância é bactericida e causa dano à membrana bacteriana, já em concentrações sub-letais, esta droga pode interferir com o metabolismo das bactérias orais por inibição do transporte de açúcar e produção ácida, e, especialmente, em estreptococos cariogênicos, por inibição de várias funções da membrana, incluindo a inibição de enzimas responsáveis pela manutenção de um pH intracelular apropriado à sua manutenção, e por inibição da protease (gingipain) no

patógeno periodontal, *Porphyromonas gingivalis* (SCHEIE et al., 1989; MARSH, 2010).

Apesar da CHX ser considerada padrão entre os antimicrobianos tópicos utilizados na odontologia, uma melhor compreensão de todas as implicações para o seu uso clínico e mecanismo de ação no *S. mutans* se faz necessária para otimizar o tratamento clínico. Assim, estudos probióticos e de biologia molecular podem elucidar os mecanismos e modificações que podem ocorrer na microbiota da cavidade oral após o uso deste produto (ANDERSSON e SHI, 2006).

Vale salientar que, embora alguns estudos *in vitro* e *in vivo* já tenham provado que a CHX é um produto com eficiente ação no controle do biofilme dental (GJERMO e ERIKSEN, 1974; REED et al., 1977; BAEHNI e TAKEUCHI, 2003; GUNSOLLEY, 2006), poucos estudos têm focado nas modificações moleculares e estruturais que podem ocorrer em células isoladas e/ou matriz do biofilme, quando expostas a diferentes concentrações de CHX.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÁRIE DENTÁRIA: ASPECTOS GERAIS

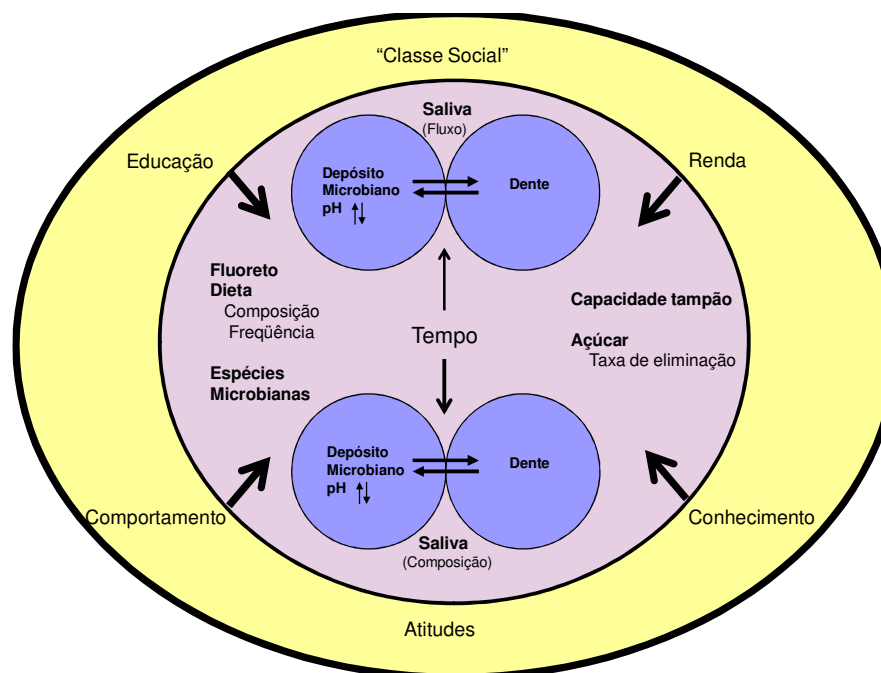
A cárie dentária é uma doença complexa causada por uma desarmonia no equilíbrio fisiológico entre os minerais do dente e o fluido do biofilme (FEJERSKOV e NYVAD, 2003). Marsh (1999) descreveu a cárie como uma consequência da interação entre a microbiota oral, a dieta, a dentição e o meio ambiente oral.

Em um conceito mais amplo, a cárie pode ser considerada uma doença infecciosa (VAN HOUTE, 1994) e transmissível (KEYES, 1960), uma vez que os micro-organismos são importantes na sua etiologia, e podem ser transmitidos de uma pessoa a outra. Porém, só a presença destes não determina o aparecimento da doença, que precisa de outros fatores: o hospedeiro, que pode ser susceptível ou não; e uma dieta

cariogênica, composta principalmente por carboidratos (KEYES, 1962). Em 1988, foi adicionado mais um fator etiológico a essa tríade: o tempo (NEWBRUM, 1988).

De acordo com Fejerskov (2004), a cárie não é uma doença infecciosa clássica, uma vez que resulta de uma modificação ecológica no biofilme da superfície do dente, levando a um desequilíbrio mineral entre o dente e o fluido da placa e, portanto, à perda do mineral da superfície dental. Assim, a cárie pertence a um “complexo” ou doença “multifatorial”, que como o câncer, doenças cardiovasculares e o diabetes, sua etiologia depende da interação de vários fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais.

Diversos fatores podem causar a cárie dentária (Figura 1). No entanto, nenhum fator causal sozinho foi identificado como o único responsável pela doença (BAELUM e FEJERSKOV, 2005). A presença de um biofilme cariogênico é considerado fator etiológico primordial da cárie dentária, mas só a presença deste não necessariamente resulta no desenvolvimento de uma lesão cariada (MALTZ, 2000).



Modificado por FEJERSKOV e MANJI, 1990.

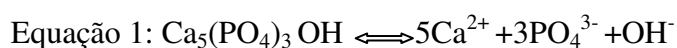
Figura 1: Ilustração esquemática da relação entre os fatores etiológicos (círculos azuis), determinantes (círculo rosa) e relacionados (círculo amarelo) com a iniciação e desenvolvimento da cárie dentária. Os fatores determinantes interagem diretamente com a superfície dentária. Os fatores relacionados não estão em contato com o dente, porém influenciam o processo de aparecimento das lesões cariosas.

O esmalte e a dentina são formados basicamente por mineral (apatita), proteína, lipídeo e água. No esmalte, 85% de seu volume corresponde à apatita, 20% por água e 3% por proteínas (enamelina) e lipídeos. O equilíbrio mineral é definido como a capacidade dos minerais (apatita) de manterem sua estrutura inalterada em função do ambiente que os circunda. No esmalte, os minerais em equilíbrio são mantidos ao redor ou dentro dos túbulos dentinários estabilizados pela matriz orgânica (colágeno) (BUZALAF et al., 2008).

A estrutura do esmalte, por ser microporosa, permite a liberação (desmineralização) ou aquisição (remineralização) de íons do ambiente bucal, a depender do pH deste (MALTZ e CARVALHO, 2003). A redução do pH provoca a dissolução do esmalte, com conseqüente transporte de cálcio e fosfato para o meio ambiente bucal (MALTZ, 2000).

Assim, caso o meio (biofilme ou saliva) se apresente subsaturado em relação ao cálcio e fosfato, a tendência é que ocorra perda de mineral do dente para o meio (Des), na tentativa de devolver o equilíbrio. O oposto também é verdadeiro, quando o meio está supersaturado, a reação é no sentido inverso (Re). No entanto, essas situações (Des e Re) dificilmente ocorrem na boca em condições fisiológicas (pH neutro), uma vez que tanto a saliva quanto o biofilme são supersaturados em relação à hidroxiapatita (HAP) e apresentam inibidores da precipitação de minerais, mantendo o equilíbrio e garantindo o equilíbrio químico entre o esmalte e a fase aquosa que o circunda. Assim, dois conceitos básicos necessitam serem definidos: produto de atividade iônica com respeito à hidroxiapatita (PAI_{HAP}) e produto de solubilidade da hidroxiapatita (KSP_{HAP}) (BUZALAF et al., 2008).

Segundo Buzalaf et al. (2008), o grau de saturação de um solução em relação à HAP depende do princípio do produto de solubilidade. Essa teoria é derivada da Lei de Ação das Massas, que afirma que a velocidade de uma reação é proporcional ao produto das massas das substâncias reagentes, cada uma elevada à potência do número de moléculas que participam. Assim, quando uma unidade de massa de hidroxiapatita se dissolve, 5 íons cálcio, 3 íons fosfato trivalentes e um íon hidroxila são liberados em solução (Equação 1).



O PAI_{HAP} é determinado multiplicando-se a concentração do íon cálcio (ou melhor, sua atividade química) elevada à 5ª potência pela concentração de fosfato trivalente elevada à 3ª potência pela concentração de hidroxila em mol/L (Equação 2):

$$\text{Equação 2: } PAI_{HAP} = (Ca^{2+})^5 \times (PO_4^{3-})^3 \times OH^-$$

Em soluções muito diluídas, a atividade de um íon é similar à sua concentração, mas à medida que a concentração de sais solúveis aumenta, a atividade torna-se significativamente menor que a concentração, devido às ações iônicas. Assim, para o cálculo do PAI_{HAP} consideram-se apenas as concentrações dos íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^- livres ativos na fase líquida que circunda o esmalte.

Quando uma solução contendo HAP está saturada e o mineral está em equilíbrio com os íons em solução, o PAI_{HAP} é igual ao KSP_{HAP} (uma constante que possui valor de $7,41 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{L}^9$ a 37°C). Então, no equilíbrio (Equação 3):

$$\text{Equação 3: } SP_{HAP} = (Ca^{2+})^5 \times (PO_4^{3-})^3 \times OH^- = 7,41 \times 10^{-60} \text{ mol/L}^9$$

O processo de dissolução do fosfato de cálcio do esmalte continua enquanto houver disponibilidade de carboidratos fermentáveis que serão metabolizados pelos micro-organismos (FEATHERSTONE, 1999). A lesão inicial de cárie apresenta, no esmalte, um aspecto poroso e esbranquiçado devido à perda mineral, e denomina-se mancha branca (ZERO, 1999). As manchas rugosas e opacas indicam lesões ativas, as manchas lisas e brilhantes indicam lesões inativas (MALTZ e CARVALHO, 2003).

Além da produção ácida nas regiões mais profundas do biofilme através do metabolismo dos carboidratos pelos micro-organismos nele presentes (MARSH, 1994), outro mecanismo também importante no desenvolvimento de lesões cáries é o aumento na concentração de polissacarídeos extracelulares que facilita a adesão dos micro-organismos com conseqüente acúmulo de biofilme (SCHEIE et al., 1989). Esta correlação entre o conteúdo de glicanos insolúveis em água e a capacidade de adesão dos micro-organismos na superfície dentária foi observada por Mattos-Graner et al. (2000).

Dentre os carboidratos oriundos da dieta, a sacarose é considerada o mais cariogênico, por ser o principal substrato utilizado na formação de dextranos microbianos extracelulares importantes para a formação do biofilme dental; por seu

elevado grau de difusão e de solubilidade; e por ter uma alta energia livre de hidrólise (BRAMSTEDT, 1975). Daí a preferência dos *Streptococcus mutans* por este dissacarídeo composto de glicose e frutose. A sacarose é também o carboidrato mais comum, o açúcar de mesa e, portanto, o mais consumido pela população. Porém, outros carboidratos de alto peso molecular, como o amido, são utilizados, especialmente em habitats protegidos e menos expostos, como, por exemplo, nas regiões proximais dos dentes. Os carboidratos quando consumidos em grandes quantidades, por meio da dieta, não são fermentados de modo direto, mas armazenados na forma de polissacarídeos intra e extracelulares (MALTZ, 2000).

2.2 RISCO DE CÁRIE

Risco de cárie pode ser definido como o risco que uma pessoa possui de desenvolver lesões cariosas em uma determinada época (KRASSE, 1988; HAUSEN, 2005). Para saber se determinada doença possui um risco maior ou menor de ocorrer, é necessária a avaliação de fatores de risco e de indicadores de risco.

Os fatores de risco para o desenvolvimento da cárie dentária são aqueles diretamente envolvidos nos eventos bioquímicos, como uma grande quantidade de biofilme presente no elemento dentário, dieta rica em carboidratos, baixa capacidade de tamponamento, redução do fluxo salivar e a presença de fluoretos, auxiliando na remineralização. Os indicadores de risco são os que agem de forma indireta, como fatores socioeconômicos, relacionados à saúde geral, epidemiológicos e clínicos (GROISMAN e MEDEIROS, 2003).

A experiência passada de cárie dentária é o mais confiável fator preditivo do incremento futuro de cárie (RAITIO et al., 1996), pois traduz o efeito acumulado de todos os fatores de risco, conhecidos ou não, aos quais os indivíduos foram expostos, sendo, desta forma, o preditor mais comumente utilizado para avaliar o risco de cárie (HAUSEN, 2005).

O Índice CPOD (Dentes Cariados, Perdidos e Obturados) é o mais utilizado no mundo para o diagnóstico das condições dentais. Para a dentição decídua (temporária),

o índice é identificado com minúsculas (ceo-d), e é correspondente ao CPO-D, com exceção dos Perdidos (P), que no ceo-d, são extrações indicadas (e), devido à dificuldade de se identificar os elementos perdidos por cárie ou esfoliação dentária (PINTO, 2000).

O Índice de Higiene Oral Simplificado (IHOS) (GREENE E VERMILLION, 1964), mede a existência de placa e tártaro na superfície vestibular do incisivo central superior direito, do incisivo central inferior esquerdo, dos primeiros molares superiores (dentes 11, 31, 16 e 26) e na superfície lingual dos dois primeiros molares inferiores (dentes 36 e 46). Os dados são anotados em ficha clínica de acordo com o seguinte escore: 0 a 1, higiene oral boa; 1 a 2, regular e 2 a 3, deficiente.

O Índice de Sangramento Gengival (ISG) (AINAMO e BAY, 1975) é realizado pela sondagem suave do sulco gengival com sonda periodontal apenas em unidades dentárias permanentes nas quatro superfícies (mesial, distal, vestibular e lingual). Os dentes em erupção são excluídos da análise. As faces sangrantes são anotadas na ficha clínica, sendo obtido o percentual de superfícies sangrantes, o ISG (%). O ISG acima de 5% é considerado alto.

Existem outros métodos de avaliação de risco de cárie, como exames microbiológicos e salivares, e um programa computadorizado desenvolvido para a plataforma windows[®] denominado Cariograma[®] (BRATTHAL, 1996). Este programa baseia-se na tríade de Keyes (KEYES, 1962) relacionando graficamente os fatores relacionados à cárie, levando em consideração os fatores individuais de risco ou de resistência (MAGALHÃES et al., 2008).

Os exames microbiológicos podem prever a susceptibilidade de indivíduos à cárie por meio da correlação entre o número de estreptococos bucais e a incidência da doença (BRATTHALL, 1980; ZICKERT et al., 1982). Uma contagem de estreptococos bucais (CEB) superior a 10^5 UFC/mL na saliva tem sido associada com um alto risco de cárie (BRATTHALL e CARLSSON, 1989). Este número indica que a maioria das superfícies está colonizada por estes micro-organismos. Um valor abaixo de 10^4 UFC/mL destes micro-organismos na saliva é considerado baixo. Com relação aos lactobacilos, um valor acima de 10^4 UFC/mL é considerado alto (KRASSE, 1988).

Testes bacteriológicos que determinam a presença de estreptococos bucais e lactobacilos no biofilme são excelentes testes de diagnóstico de risco de cárie. Porém, como essa quantificação no biofilme é trabalhosa e há uma relação clara entre o número destes micro-organismos na saliva e o número de sítios colonizados, este último geralmente é o método de escolha (BRATTHALL e ERICSSON, 1994; MALTZ e CARVALHO, 2003). No entanto, alguns estudos têm sido realizados utilizando amostras de biofilme dental (SÁNCHEZ-PÉREZ e ACOSTA-GÍO, 2001). Segundo estes estudos, a correlação entre a concentração de estreptococos bucais e a incidência de cárie apresentou uma melhor acurácia nas amostras de biofilme que nas de saliva. Outros autores observaram que a seleção da amostra, biofilme ou saliva, afeta a contagem de estreptococos do grupo *mutans* (KÖHLER et al., 1981; BEIGHTON, 1986; BOWDEN, 1997).

Em relação à saliva e sua utilização na clínica para a identificação do risco de cárie do paciente, dois fatores salivares são utilizados: o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva (MALTZ e CARVALHO, 2003). Estes fatores são geralmente elevados em crianças e variam de acordo com a idade e o tamanho da glândula salivar. Os indivíduos que apresentam secreção salivar extremamente baixa (xerostomia) têm atividade cariogênica elevada (RAVALD e BIRKHED, 1991). No entanto, alguns estudos demonstraram que essa relação é fraca ou estatisticamente inexistente (SUNDIN et al., 1992).

2.3 BIOFILME DENTAL

Segundo Marsh (2004), a placa bacteriana dental, pode ser definida como uma comunidade diversa de micro-organismos encontrados na superfície dos dentes como um biofilme, embebidos em uma matriz de polímeros de origem microbiana e do hospedeiro.

A capacidade de reorganização da placa bacteriana dental em um curto espaço de tempo e o fato de existir em sua estrutura um equilíbrio dinâmico que rege sua formação, desenvolvimento e adaptação ao meio ambiente, permitem a este sistema funcionar como um biofilme, daí a denominação de biofilme dental (CUNHA, 2000).

As fases de desenvolvimento do biofilme dental são as seguintes: adsorção de glicoproteínas bacterianas e do hospedeiro na superfície dentária; transporte passivo de bactérias orais na superfície dentária; co-adesão dos colonizadores tardios aos colonizadores já aderidos inicialmente; multiplicação dos micro-organismos aderidos na superfície dentária; e separação ativa dos micro-organismos da superfície dentária (MARSH, 2004).

Dentre as propriedades principais dos biofilmes, destacam-se a presença de canais e lacunas; a produção de polímeros extracelulares para formar uma matrix funcional; a resistência aumentada a CHX e outros antimicrobianos; a produção de β -Lactamase por células vizinhas para proteger organismos sensíveis; a síntese de proteínas novas; a regulação da expressão gênica da *gtfBC*; a produção de moléculas sinalizadoras célula-célula; gradientes de pH e O₂; a co-adesão; anaeróbios obrigatórios em um ambiente predominantemente aeróbico; e o catabolismo completo de moléculas complexas do hospedeiro (mucinas) por consórcio (MARSH, 2004).

As características de micro-organismos organizados em biofilmes e crescidos sobre uma superfície são diferentes dos fenótipos expressos pelos mesmos organismos em uma cultura líquida convencional (FEJERSKOV e KIDD, 2005). Além disso, devido à organização estrutural e funcional que apresentam, os biofilmes podem ser 1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos (MARSH e MARTIN, 2005).

Em relação à cárie dentária, o perfil dos micro-organismos presentes no biofilme dental é decisivo para o estabelecimento de uma microbiota virulenta ou não no sentido do desenvolvimento de lesões cariosas; sendo, portanto, mais virulento um biofilme composto de maior número de bactérias que sobrevivem em meio ácido (acidúricas) e que produzem ácido (acidogênicas), uma vez que o ácido (principalmente o ácido láctico), produzido por estes, provocará a perda de minerais da superfície do esmalte, dando início à lesão cariosa (BEZERRA e TOLEDO, 2003).

2.4 ESTREPTOCOCOS BUCAIS E SUA RELAÇÃO COM A CÁRIE DENTÁRIA

Os estreptococos fazem parte da microbiota oral residente (MARSH e MARTIN, 2005) e são comumente encontrados na cavidade oral e no trato respiratório superior (HAMADA e SLADE, 1980). Dentre estes estreptococos, os isolados com mais frequência na mucosa oral são os *Streptococcus sanguis* e os *Streptococcus mitis*. Os menos comuns são os *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus oralis* (MARSH e MARTIN, 2005).

O irrompimento dos dentes modifica a microbiota bucal, pois alguns micro-organismos necessitam de superfícies duras para a colonização, como é o caso do *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. Em bebês com poucas semanas de vida e, portanto, edentados, podemos identificar *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* (LLENA-PUY et al., 2000; CORREIA, 1998; MARSH e NYVAD, 2005).

A microbiota se torna mais complexa à medida que as crianças atingem a idade de 2 anos ou mais, pois com a constante erupção dentária neste período, há o aumento da quantidade de micro-organismos encontrados no biofilme dental, tornando o ambiente mais propício para o estabelecimento de bactérias cariogênicas (CORREIA, 1998).

Os estreptococos bucais são representados por: *Streptococcus cricetus*, sorotipo *a*; *Streptococcus rattus*, sorotipo *b*; *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae*; *Streptococcus downei*, sorotipo *h*; *Streptococcus sobrinus*, sorotipos *d* e *g*; e *Streptococcus mutans*, sorotipos *c*, *e* e *f* (MARSH e MARTIN, 2005), sendo as duas últimas espécies mais associadas à cárie em humanos (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1994). O *S. mutans* é a mais comum das espécies bacterianas isoladas do biofilme dental humano; a segunda mais prevalente é o *S. sobrinus* (FEJERSKOV e KIDD, 2005).

Apesar do *S. sobrinus* ter sido associado à cárie dentária em humanos (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; KOGA et al., 2002), existem poucos estudos sobre o papel deste micro-organismo na doença. Alguns estudos não tentaram distingui-lo do *S. mutans*, e em outros o meio de cultura mitis salivarius bacitracin

(MSB) (GOLD et al., 1973) foi utilizado para cultivá-lo, o que pode ter inibido seu crescimento (MARSH e MARTIN, 2005). Vários métodos têm sido desenvolvidos para distinguir estas espécies (CANGELOSI et al., 1994; DE SOET et al., 1990), alguns baseados na detecção dos micro-organismos por meio da PCR simples ou com variações, em amostras de saliva (OHO et al., 2000; YOSHIDA et al., 2003) ou de biofilme dental (OKADA et al., 2002; SATO et al., 2003b).

O *S. sobrinus* é considerado o micro-organismo mais acidogênico dos estreptococos orais (de SOET et al., 1989) e seu mecanismo de tolerância ácida é diferente ao do *S. mutans* (NASCIMENTO et al., 2004). Um estudo utilizando a técnica da PCR indicou que o *S. sobrinus* pode ser mais prevalente que o indicado em estudos utilizando cultura de micro-organismos, e raramente está presente no mesmo nível que o *S. mutans* na placa (OKADA et al., 2002).

A razão para a inabilidade do *S. sobrinus* proliferar parece ser devido à incapacidade para transportar a N-acetilglicosamina, um processo que requer energia e que diminui os níveis intracelulares de fosfoenolpiruvato, importante para a obtenção de energia do micro-organismo (HOMER et al., 1993). Quando a fonte externa de carboidratos fermentáveis é alta, ou o meio ambiente é muito ácido, como nas pessoas bulímicas, este efeito inibitório torna-se insignificante e o *S. sobrinus* prolifera (BRETZ et al., 1993). Em estudo realizado com crianças de 3 a 5 anos, em que os dois micro-organismos foram identificados, o incremento de cárie foi maior (OKADA et al., 2005).

As demais espécies do gênero *Streptococcus* têm potencial cariogênico baixo, como é o caso dos estreptococos do grupo *mitis* e *salivarius*, mas suas interações no biofilme dental podem ser importantes para o estabelecimento e manutenção da microbiota oral e cariogenicidade do biofilme (NYVAD e KILIAN, 1990). Alguns estudos demonstraram a capacidade do *S. salivarius* de causar lesões de cárie em ratos (ORLAND e BLANEY, 1955; BRAILSFORD et al., 2001). Não há muitos estudos a respeito da cariogenicidade do *S. salivarius*, porém sabe-se que possui capacidade cariogênica, uma vez que, da mesma forma que os estreptococos do grupo *mutans*, também produzem glucanos solúveis e insolúveis a partir da sacarose (MARSH e MARTIN, 2005).

Os estreptococos do grupo *salivarius* são formados por: *S. salivarius*; *S. thermophilus* (intimamente relacionado e não encontrado na boca); e o *S. vestibularis*

(descrito recentemente). O *S. salivarius* coloniza preferencialmente as superfícies mucosas, especialmente o dorso da língua; e produzem um frutano extracelular que dá origem a colônias mucóides grandes quando cultivadas em ágar contendo sacarose (MARSH e MARTIN, 2005).

2.4.1 *Streptococcus mutans*

O *Streptococcus mutans*, um micro-organismo constantemente associado à cárie dentária (SILVA et al., 2008), tem desenvolvido ao longo do tempo e com êxito, múltiplos mecanismos para sua sobrevivência, colonização e presença contínua na cavidade oral humana. Estas bactérias produzem os ácidos láctico, acético, fórmico e propiônico através da metabolização dos carboidratos ingeridos na dieta pelo hospedeiro humano (LOESCHE, 1986; CARLSSON e HAMILTON, 1994). Estes ácidos provocam a perda de minerais da superfície do dente (FEATHERSTONE, 1990), sendo o ácido láctico o mais relacionado com a dissolução da estrutura dentária de elementos hígidos (MARGOLIS e MORENO, 1990).

Estes micro-organismos produzem polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis (glucanos e frutanos) a partir da sacarose, que são associados com a formação de placa e cariogenicidade; e polissacarídeos intracelulares que atuam como reservas de carboidratos e podem ser convertidos em ácido durante períodos em que os carboidratos da dieta não estão disponíveis. De acordo com Marsh e Martin (2005), o potencial cariogênico deste grupo é elevado por serem capazes de produzir ácido de forma rápida e conseguirem crescer e sobreviver sob estas condições.

Estes micro-organismos são associados tanto com o início da lesão de cárie como com o consumo de sacarose (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; KOGA et al., 2002). Porém, ocasionalmente, também são associados a infecções não orais, principalmente à endocardite bacteriana (HERZBERG, 2000).

Pesquisas recentes têm estudado o *Streptococcus mutans* (ZHU et al., 2001; SATO et al., 2003a; REDMO et al., 2003; NAKANO et al., 2005), e seu genoma já está totalmente seqüenciado (AJDIC et al., 2002), sendo composto por 2.030.936 pares de

nucleotídeos. As funções de aproximadamente 63% destes genes já são conhecidas, como manutenção de seu metabolismo, defesa contra fatores do hospedeiro e contra outras espécies bacterianas (Figura 2), o que pode levar a novas estratégias para prevenção e tratamento da cárie.

Segundo Marsh e Martin (1992), a relação entre *S. mutans* e cárie dentária não é absoluta. Altas proporções de *S. mutans* podem persistir na superfície do dente sem progressão da cárie, assim como cáries também podem se desenvolver na ausência destas espécies (LOESCHE e STRAFFON, 1979). O nível de estreptococos do grupo *mutans* na saliva de crianças não pode predizer um incremento futuro de cárie (MATEE et al., 1993). Da mesma forma, os indivíduos que possuem um alto nível destes micro-organismos, não necessariamente desenvolvem cáries (KLEINBERG, 2002).

Uma vez que a cárie é consequência da interação de vários fatores, é reconhecido que a iniciação de cáries, na ausência ou presença de estreptococos do grupo *mutans*, pode ser explicada pela relação dinâmica entre os fatores de consumo de carboidratos, composição e potencial acidogênico do biofilme dental, e atividade de cárie (BEIGHTON, 2005). Os *S. mutans* são os micro-organismos mais prevalentes e os mais associados às lesões de cárie (SILVA et al., 2008), justificando estudos em nível molecular que visem um melhor entendimento do metabolismo desta bactéria, especialmente em situações de estresse.

2.5 GLICOSILTRANSFERASES

A maioria dos estreptococos orais produz as enzimas glicosiltransferases, que fazem parte de um extenso grupo de enzimas: as glicosacarases, as quais são enzimas extracelulares produzidas principalmente pela bactéria de solo *Leuconostoc mesenteroides* (dextranosacarases) e por bactérias lácticas (*Lactococci*) (SIDEBOTAN, 1974). Estas enzimas catalizam, a partir da sacarose, a síntese de polímeros de alta massa molecular, chamados glicanos, e também, os de baixa massa molecular, quando moléculas aceptoras eficientes, como a maltose ou isomaltose, são adicionadas ao meio de reação (KOEPSELL et al., 1953).

As glicosiltransferases dos estreptococos orais produzem glicanos insolúveis ou solúveis em água, que aumentam a adesão e colonização de bactérias cariogênicas nas superfícies dentárias, como os *Streptococcus mutans*, desempenhando, assim, um papel chave no processo cariogênico (MONCHOIS et al., 1999).

Estas enzimas estão envolvidas na síntese de partes de carboidratos das glicoproteínas, glicolipídeos e glicosaminoglicanos, que possuem papéis específicos no crescimento celular e nas interações célula-célula (CROCKER e FEIZI, 1996), na adesão celular (incluindo fertilização) (TALBOT et al., 2003; AKAMA et al., 2002), modulação por fatores de crescimento (TAKAHASHI et al., 2004), defesa imune (RUDD et al., 2001), inflamação (LOWE, 2003) e infecções virais e parasitárias (SACKS e KAMHAWI, 2001).

Por desempenharem um papel tão importante no processo cariogênico, as GTFs são candidatas potenciais a uma possível vacina anticárie (SHAH et al., 2004). As seqüências de 14 diferentes genes destas enzimas já foram estudadas e codificadas (chamadas *gtf*) em diversas pesquisas (AOKI et al., 1986; SHIROZA et al., 1987; UEDA et al., 1988; SIMPSON et al., 1995).

Uma região não-conservada localizada na região adjacente ao peptídeo sinal foi descoberta devido à comparação entre as *gtfs* de alguns estreptococos orais, como os *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. gordonii* (HOSHINO et al., 2004), sendo a região 5' terminal do gene *gtf* conservada no *S. mutans* (FUJIWARA et al., 1998) e *S. oralis* (FUJIWARA et al., 2000). Portanto, essa região do gene *gtf* é uma seqüência específica de cada espécie dos estreptococos orais, podendo ser usada para sua identificação (HOSHINO et al., 2004).

As glicosiltransferases catalisam a transferência de unidades de glicosila a partir da sacarose, sendo a síntese dos diferentes produtos dependentes do destino destas unidades (MOOSER, 1992) (Figura 3). A reação de síntese de dextrano ocorre por transferência sucessiva de unidades de glicosila para a cadeia polimérica nascente. Estas enzimas também podem hidrolisar a sacarose em meio aquoso e a síntese de oligossacarídeos é induzida pela transferência de unidades de glicosila sobre o esqueleto das moléculas aceptoras, no meio de reação. Seja qual for o destino das unidades de glicosila, sua transferência envolve primeiro a formação de um complexo covalente glicosila-enzima (ROBYT et al., 1974).

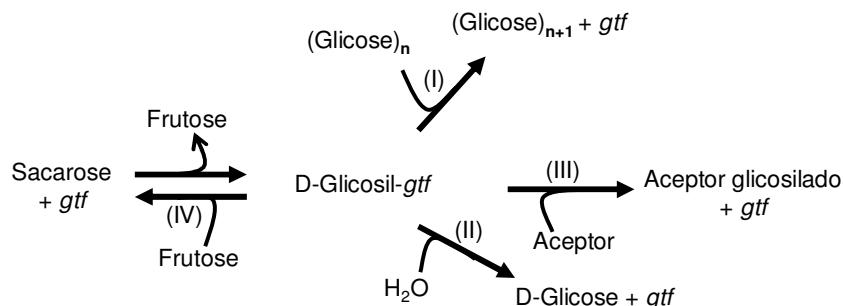


Figura 3: Reações catalisadas por glicosiltransferases. I, Síntese de glicanos por transferência sucessiva de unidades de glicosila; II, hidrólise da sacarose; III, síntese de oligossacarídeos; IV, síntese de sacarose (reação reversa do complexo glicosil-gtf)

O único doador natural de substrato (unidades glicosila) para esta síntese é a sacarose, induzindo uma mudança na conformação da proteína que, por sua vez, pode ativar o sítio catalítico. A energia necessária para catalisar todas as reações vem apenas da clivagem de ligações glicosídicas da sacarose. A reação ocorre com a retenção da configuração α durante a clivagem da ligação glicosídica. A síntese de glucanos ocorre por autopolimerização e é um mecanismo em cadeia único, sendo este alongamento catalisado por um único tipo de enzima (MONCHOIS et al., 1999).

Estas enzimas são extremamente relacionadas e possuem uma estrutura em comum (Figura 4), sendo compostas por quatro domínios estruturais distintos (GIFFARD et al., 1993; SIMPSON et al., 1995), além de apresentarem uma região altamente conservada de cerca de 1000 aminoácidos, denominada domínio catalítico (MONCHOIS et al., 1996).

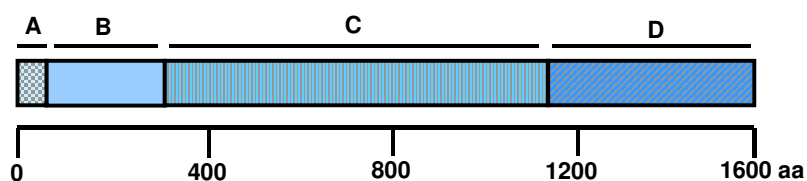


Figura 4: Estrutura gênica esquemática das glicosiltransferases; A, peptídeo sinal; B, região variável; C, extremidade amino que contém o domínio catalítico; D, extremidade carboxila que contém o domínio de ligação à matriz glicana.

2.6 CLOREXIDINA

A CHX (Figura 5) foi primeiramente sintetizada nos anos 40 e introduzida no mercado em 1954 como um anti-séptico para ferimentos na pele (DAVIES et al., 1954). Esta substância se caracteriza por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos.

Desta forma, ela foi testada primeiramente por Løe e Schiott (1970), no qual demonstraram que bochechos de uma solução de gluconato de CHX 0,2%, realizados duas vezes por dia, se mostraram eficazes em diminuir o crescimento do biofilme bacteriano e o desenvolvimento de gengivite clinicamente detectáveis por um período de 21 dias.

Cerca de 30% de uma solução de CHX fica retida na boca após um bochecho (RÖLLA e MELSEN, 1975). Esta substância adsorve-se a compostos aniônicos, devido à sua natureza catiônica, como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral (GJERMO e ERIKSEN, 1974; BONESVOLL et al., 1974).

A CHX é uma substância estável, não tóxica aos tecidos, sua absorção pela mucosa e pele é pequena, além de ser bem tolerada quando administrada via parenteral e intravenosa, parece não atravessar a barreira placentária e não provoca alterações na microbiota oral, nem efeitos tóxicos colaterais sistêmicos com o uso prolongado (DAVIES e HULL, 1973; CASE, 1977; RUSHTON, 1977; WINROW, 1973; LÖE e SCHIÖTT, 1976).

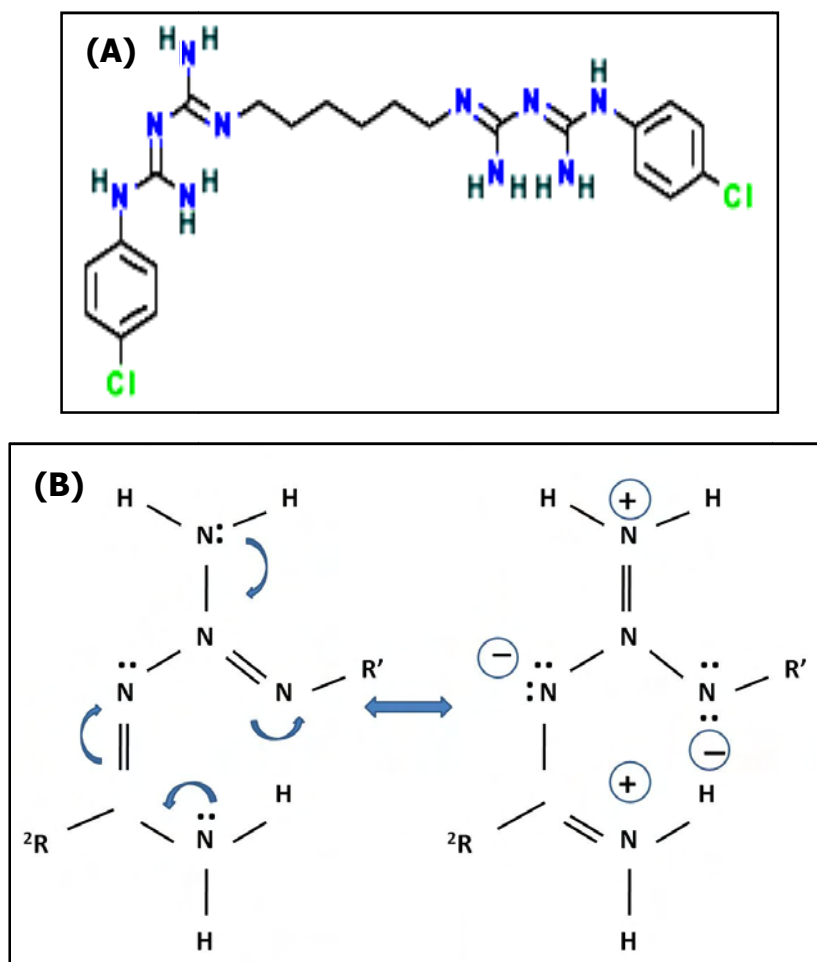


Figura 5: Fórmulas da clorexidina: não protonada (A) e protonada (B).

Dentre as diversas formas de utilização da clorexidina, como enxaguatórios, dentifrícios, palitos, géis, sprays, chicletes e vernizes (FLÖTRA, 1973; PILLON, 2001; LUOMA, 1992), a mais utilizada inicialmente foi por meio de enxaguatórios, utilizando 10 mL de uma solução de clorexidina a 0,2%, por duas vezes ao dia (CUMMING e LÖE, 1973). Porém, estudos posteriores demonstraram que diminuindo a concentração do produto e aumentando o volume da solução, a efetividade anti-placa era semelhante, com uma redução dos efeitos colaterais. Desta forma, a concentração das soluções para bochechos foi reduzida para 0,12% e utilizadas com um volume de 15 mL (SEGRETO et al., 1986, SMITH et al., 1995). O tempo de duração do bochecho recomendado é de 1 minuto nestas concentrações.

Apesar de sua eficácia, a clorexidina possui alguns efeitos adversos, como alterações do paladar, pigmentação dos dentes, de restaurações, de próteses e da língua

e, mais raramente, descamações na mucosa oral, tumefação reversível nos lábios ou glândulas parótidas, urticária, dispnéia e choque anafilático (FLÖTRA et al., 1971; ADDY et al., 1979; OKANO et al., 1989; CIANCIO, 1995). Dentre esses efeitos colaterais, a pigmentação dental é o principal fator limitante do uso da clorexidina por períodos prolongados, sendo considerada a principal queixa por parte dos pacientes (ALBANDAR et al., 1994).

Esta substância é um agente antimicrobiano de amplo espectro, cujos efeitos são mais potentes em micro-organismos gram-positivos que em gram-negativos (EMILSON, 1977). A CHX reduz a quantidade de estreptococos do grupo *mutans* em relação a outras bactérias em placa dental e saliva (EMILSON e FORNELL, 1976; LÖE e SCHIÖTT, 1976).

Esta droga apresenta substantividade elevada, ou seja, seu tempo de permanência ativa na cavidade bucal é de aproximadamente 12 horas, fato explicado pela sua natureza dicatiônica, de forma que, uma extremidade catiônica da molécula se prende à película, que apresenta carga negativa, e a outra extremidade catiônica fica livre para interagir com bactérias que buscam colonizar o dente. Assim, apresenta uma ação bactericida inicial imediatamente após o seu uso, e uma ação bacteriostática prolongada (BONESVOLL e GJERMO, 1978).

O seu mecanismo de ação antibacteriano baseia-se principalmente na sua natureza catiônica, sendo rapidamente atraída pela carga negativa da superfície da bactéria, cuja adsorção à membrana celular, concentração-dependente, é feita por interações eletrostáticas. Assim, em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (HJELJORD et al., 1973; HUGO e LONGWORTH, 1964; RÖLLA e MELSEN, 1975).

Segundo Marsh et al. (1983), a CHX em baixas concentrações, tem um efeito bacteriostático baseado no distúrbio de algumas funções celulares, como enzimas e receptores celulares bacterianos e que, em elevadas concentrações, a CHX causa precipitação ou coagulação citoplasmática.

De acordo com Hugo e Longworth (1966), em baixas concentrações, a interação desta substância com a membrana celular, reduz a fluidez da membrana e afeta a capacidade osmorregulatória e metabólica da membrana e suas enzimas contidas. Em altas concentrações, as interações são mais severas e levam a membrana a adotar um estado cristalino líquido, com perda de sua integridade estrutural, permitindo a perda de materiais celulares (LONGWORTH, 1971; CHAWNER e GILBERT, 1989a,b,c).

Ainda, segundo Scheie et al. (1989) e Marsh (2010), em elevadas concentrações, a CHX é bactericida e causa dano letal à membrana bacteriana, e em concentrações sub-letais, pode interferir com o metabolismo das bactérias orais por inibição do transporte de açúcar e produção ácida em estreptococos cariogênicos; por inibição de várias funções da membrana em estreptococos, incluindo a inibição de enzimas responsáveis pela manutenção de um pH intracelular apropriado; e por inibição da protease gengival no patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis*.

De acordo com Deng et al., (2009), as células presentes no biofilme dental perdem sua viabilidade, somente em altas concentrações de CHX, quando sua atividade metabólica é completamente bloqueada, enquanto concentrações bacteriostáticas de antimicrobianos afetam apenas a atividade metabólica das bactérias.

A ação da CHX está condicionada a sua adsorção inicial à película dental, exercendo localmente sua ação bactericida e bacteriostática (JENKINS et al., 1988; ADDY e MORAN, 1983). O cálcio, o flúor e alguns detergentes aniônicos podem influenciar as ligações da clorexidina, reduzindo sua adsorção e sua atividade antibiótica (RÖLLA e MELSEN, 1975; BONESVOLL, 1977; BARKVOLL et al., 1989). Em relação ao pH bucal, uma maior retenção da droga é alcançada quando o pH apresenta uma variação entre 6.4 a 9.0 (GJERMO e ERIKSEN, 1974).

A natureza catiônica da CHX promove conexão com o componente aniônico da superfície bacteriana (grupos fosfato dos ácidos teicóicos em bactérias Gram-positivas e lipopolissacarídeos em bactérias Gram-negativas) capazes de alterar sua integridade. A alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática promove precipitação de proteínas citoplasmáticas, altera o balanço osmótico celular, interfere com o metabolismo, crescimento, divisão celular, inibe a ATPase da membrana e o

processo anaeróbico (RÖLLA e MELSEN, 1975; JENKINS et al., 1988; HUGO e RUSSEL, 1992).

Foi reportado que a CHX inibe as ATPases ligadas e não-ligadas à membrana como também a absorção de K^+ em *Enterococcus faecalis* (HAROLD et al., 1969). Entretanto, somente em altas concentrações inibe as ATPases ligadas à membrana (CHOPRA, 1987), o que sugere que a enzima não é um alvo primário da ação da CHX. A ruptura da membrana provocada pela CHX, ao invés da inativação da ATPase, é que está associada aos seus efeitos letais (BARET-BEE et al., 1994; KUYAKANOND e QUESNEL, 1992).

Tattawasart et al., (2000), utilizando microscopia eletrônica de varredura, observou que células plantônicas de *Pseudomonas stutzeri* sensíveis à CHX, quando expostas a concentrações mais elevadas da droga, sofreram rompimento da membrana. Este rompimento da membrana pode ser explicado pelo fato da CHX, carregada positivamente, se ligar fortemente às membranas das bactérias por causa de sua carga negativa oposta, ocasionando o rompimento da membrana por perturbação destes sítios (GILBERT e MOORE, 2005).

Segundo Rolla, Løe e Schiott (1971), a CHX possui uma elevada afinidade com proteínas e hidroxapatita. A inibição da formação de placa, observada *in vivo*, pode ocorrer quando concentrações sub-MIC da droga são utilizadas (RADFORD et al., 1992), por mecanismos desconhecidos. No entanto, é possível afirmar que a redução na formação da matriz do biofilme exposta às baixas concentrações de CHX pode estar relacionada com a afinidade da CHX com proteínas.

Segundo Dunne (2002), este antimicrobiano mata somente as bactérias das camadas mais externas do biofilme, deixando os micro-organismos saudáveis nas camadas mais internas, permitindo o crescimento destas bactérias posteriormente, quando a CHX se desliga das mesmas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Correlacionar a presença de estreptococos orais no biofilme dental de crianças com diferentes padrões de cárie dentária; e avaliar a atividade antibacteriana do gluconato de clorexidina (CHX) em *Streptococcus mutans* plantônicos e organizados em biofilme, em diferentes concentrações e períodos de crescimento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Detectar a prevalência de estreptococos bucais em crianças com cárie e livres de cárie por meio da técnica da PCR e correlacionar com dados clínicos como índices de cárie (ceo-d e CPO-D) e de higiene oral (IHOS), fluxo e pH salivar;
- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima da CHX em *S. mutans* UA159 isolados e em biofilmes de 18 h de crescimento;
- Quantificar as células plantônicas em períodos de crescimento distintos e organizadas em biofilme de 18 h, expostas a diferentes concentrações de clorexidina, por meio de métodos microbiológicos;
- Diferenciar e quantificar a expressão das glicosiltransferases *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* de *S. mutans* UA159 plantônicos e em biofilmes de 18h, na presença e ausência de CHX em diferentes concentrações, utilizando o PCR em tempo real;
- Verificar as modificações morfológicas dos *S. mutans* plantônicos com crescimento de 2, 4 e 6h, e em biofilmes de 2 e 4 h, expostos ou não a diferentes concentrações de CHX, por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura.

REFERÊNCIAS

ADDY, M.; PRAYITNO, S.; TAYLOR, L.; CADOGAN, S. An *in vitro* study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. **J Periodontal Res**, v. 14, n. 5, p. 403-10, 1979.

ADDY, M.; MORAN, J. Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. **J Clin Periodontol**, v. 10, n. 1, p. 69-71, 1983.

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, v. 25, n. 4, p. 229-235, 1975.

AJDIC, D.; McSHAN, W. M.; McLAUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETTI, J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. **PNAS**, v. 99, n. 22, p. 14434-14439, 2002.

AKAMA, T. O. et al. Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with Sertoli cells. **Science**, v. 295, p. 124-127, 2002.

ALBANDAR, J. M.; GJERMO, P.; PREUS, H. R. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. **J Periodontol**, v. 65, n. 2, p. 109-112, 1994.

ANDERSSON, M. H.; SHI, W. A. probiotic approach to caries management. **Pediatric Dent**, v. 28, n. 2, p. 151-153, discussion: 192-198, 2006.

AOKI, H. et al. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infect Immun**, v. 53, p. 587-594, 1986.

BAEHNI, P. C.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral Dis**, v. 9 (Suppl. 1), p. 23-29, 2003.

BAELUM, V.; FEJERSKOV, O. Diagnóstico da Cárie Dentária: Um Momento de Reflexão a Caminho da Intervenção? In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A Doença e seu Tratamento Clínico**. Ed. Santos. São Paulo, 2005.

BARETT-BEE, K.; NEWBOULT, L.; EDWARDS, S. The membrane destabilizing action of the antibacterial agent chlorhexidine. **FEMS Microbiol Lett**, v. 119, p. 249-254, 1994.

BARKVOLL, P.; RÖLLA, G.; SVENDSEN, K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate *in vivo*. **J Clin Periodontol**, v. 16, n. 9, p. 593-595, 1989.

BEIGHTON, D. A simplified procedure for estimating the level of *Streptococcus mutans* in the mouth. **Br Dent J**, v. 160, p. 329-330, 1986.

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

BEZERRA, A. C. B.; TOLEDO, O. A. Nutrição, dieta e cárie. In: KRIGER, L. **Promoção de Saúde Bucal**. 3:ed. São Paulo: Artes Médicas, Cap. 3, p. 43-68, 2003.

BONESVOLL, P. Influence of ionic strength, calcium, sodium dodecyl sulphate and urea on the retention of chlorhexidine in the human mouth after mouth rinses. **Arch Oral Biol**, v. 22, n. 4, p. 273-279, 1977.

BONESVOLL, P.; LÖKKEN, P.; RÖLLA, G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Arch Oral Biol**, v. 19, n. 11, p. 1025-1029, 1974.

BONESVOLL, P.; GJERMO, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. **Arch Oral Biol**, v. 23, n. 4, p. 289-94, 1978.

BOWDEN, G. H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 25, p. 76-81, 1997.

BRAILSFORD, S.R.; SHAH, B.; SIMONS, D.; GILBERT, S.; CLARK, D.; INES, I. et al. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. **J Dent Res**, v. 80, p. 1828-1833, 2001.

BRAMSTEDT, F. Teeth and Nutrition. **Bibl Nutr Dieta**, v. 22, p. 1-16, 1975.

BRATTHALL, D. Selection for prevention of high risk groups. **J Dent Res**, v. 59 (DII), p. 2178-2182, 1980.

BRATTHALL, D.; CARLSSON, P. Clinical microbiology of saliva. In: Tenuvio, J.O. (Ed.), *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*. **CRC Press**, p. 204-223, 1989.

BRATTHALL, D.; ERICSSON, D. Testes for assessment of caries tsk. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Textbook of clinical Cariology**. 2 ed. Copenhagen: Munksgaard, p.239-257, 1994.

BRATTHALL, D. Dental caries: intervened-interrupted-interpreted. Concluding remarks and cariography. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 4, p. 486-491, 1996.

BRETZ, W. A.; KRAHN, D. D.; DRURY, M.; SCHORK, N.; LOESCHE, W. J. Effects of fluorexitine on the oral environment of bulimics. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, p. 62-64, 1993.

BUZALAF, M. A. R. et al. Mecanismo de Ação do Fluoreto no Controle da Cárie Dentária. In: BUZALAF, M. A. R. **Fluoretos e saúde bucal**. 1. ed. São Paulo: Santos, v. 1, 316 p, 2008.

CANGELOSI, G. A.; IVERSEN, J. M.; ZUO, Y.; OSWALD, T. K.; LAMONT, R. J. Oligonucleotide probes for *mutans* streptococci. **Mol Cell Probes**, v. 8, p. 73- 80, 1994.

CARLSSON, J.; HAMILTON, I. R. Metabolic activity of oral bacteria, 2nd ed. **Munksgaard**, Copenhagen, Denmark, 1994.

CASE, D. E. Safety of Hibitane. I. Laboratory experiments. **J Clin Periodontol**, v. 4, n. 5, p. 66-72, 1977.

CHAWNER, J. A.; GILBERT, P. A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine. **J Appl Bacteriol**, v. 66, p. 243-252, 1989a.

CHAWNER, J. A.; GILBERT, P. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. **J Appl Bacteriol**, v. 66, p. 253-258, 1989b.

CHAWNER, J. A.; GILBERT, P. Adsorption of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine to *Escherichia coli* cells and to isolated membrane components. **Int J Pharm**, v. 55, p. 209–215, 1989c.

CHOPRA, I. Microbial resistance to veterinary disinfectants and antiseptics, p. 43–65. In A. H. Linton, W. B. Hugo, and A. D. Russell (ed.), Disinfection in veterinary and farm animal practice. **Blackwell Scientific Publications Ltda**, Oxford, England, 1987.

CIANCIO, S. G. Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. **Periodontol 2000**, v. 8, p. 75-86, 1995.

CORREIA, M. S. N. P. **Odontopediatria na primeira infância**. São Paulo: Livraria Santos Editora, p. 679, 1998.

CROCKER, P. R.; FEIZI, T. Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. **Curr Opin Struct Biol**, v. 6, p. 679-691, 1996.

CUMMING, B. R.; LÖE, H. Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. **J Periodontal Res**, v. 8, n. 2, p. 57-62, 1973.

CUNHA, J. J. **Compêndio de periodontia**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, p.322, 2000.

DAVIES, R. M.; HULL, P. S. Plaque inhibition and distribution of chlorhexidine in beagle dogs. **J Periodontal Res Suppl**, v. 12, p. 22-27, 1973.

DAVIES, G. E.; FRANCIS, J.; MARTIN, A.R.; ROSE, F. L.; SWAIN, G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 9, n. 2, p. 192-196, 1954.

DE SOET, J. J.; HOLBROOK, W. P.; van AMERONGEN, W. E.; SCHIPPER, E.; HOMBURG, C.H.; de GRAAFF, J. Prevalence of *Streptococcus sobrinus* in relation to dental caries in children from Iceland and The Netherlands. **ASDC J Dent Child**, v. 57, p. 337-342, 1990.

DE SOET, J. J.; TOORS, F.A.; de GRAAFF, J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. **Caries Res**, v. 23, p. 14-17, 1989.

DENG, D. M.; HOOGENKAMP, J. M.; TEN CATE, J. M. et al. Novel metabolic activity indicator in *Streptococcus mutans* biofilms. **J Antimicrobiol Methods**, 2009.

DUNNE, W. M. Jr. Bacterial adhesion: Sean any good biofilms lately? **Clin Microbiol**, v. 15, p. 155-166, 2002.

EMILSON, C. G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. **Scand J Dent Res**, v. 85, p. 255-65, 1977.

EMILSON, C. G.; FORNELL, J. Effect of toothbrushing with chlorhexidine gel on salivary microflora, oral hygiene, and caries. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 84, p. 308-319, 1976.

FEATHERSTONE, J. D. B. An update understanding of the mechanism of dental decay and its prevention. **Nutr Q**, v. 14, p. 5-11, 1990.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. **Caries Research**, v. 38, p. 182-191, 2004.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A Doença e seu Tratamento Clínico**. Ed. Santos. São Paulo, 2005.

FEJERSKOV, O.; MANJI, F. Risk assessment in dental caries . In: **Risk assessment in dentistry** (D. Baderj, org.) Chapel Hill: University of North Carolina Dental College, p. 215-217, 1990.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B. Is dental caries an infections disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner; in Schou L (ed): **Nordic Dentistry 2003 Yearbook**. Copenhagen, Quintessence Publishing, p. 141-151, 2003.

FLÖTRA, L.; GJERMO, P.; RÖLLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. **Scand J Dent Res**, v. 79, n. 2, p. 119-125, 1971.

FLÖTRA, L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. **J Periodontal Res Suppl**, v. 12, p. 41-44, 1973.

FUJIWARA, T.; TERAQ, Y.; HOSHINO, T.; KAWABATA, S.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S.; KIMURA, S.; HAMADA, S. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 161, p. 331-336, 1998.

FUJIWARA, T.; HOSHINO, T.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*. **Infect Immun**, v. 68, p. 2475-2483, 2000.

GIFFARD, P. M. et al. Sequence of the *gtfK* gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gtf* genes of oral streptococci. **J Gen Microbiol**, v. 139, p. 1511-1522, 1993.

GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **J Appl Microbiol**, v. 99, p. 703-715, 2005.

GJERMO, P.; ERIKSEN, H. M. Unchanged plaque inhibiting effect of chlorhexidine in human subjects after two years of continuous use. **Arch Oral Biol**, v. 19, p. 317-319, 1974.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, V. J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol**, v. 18, p. 1357-1364, 1973.

GREENE, J. C.; VERMILLION, J. R. The simplified oral hygiene index. **J Am Dent Assoc**, v. 68, n. 7, 1964.

GROISMAN, S.; MEDEIROS, U. Cariologia e a Clínica. In: KRIGER, L. **Promoção de Saúde Bucal**. 3:ed. São Paulo: Artes Médicas, Cap. 4, p. 69-87, 2003.

GUNSOLLEY, J. C. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and anti-gingivitis agents. **J Am Dent Assoc**, v. 137, n. 12, p. 1649-57, 2006.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, v. 44, p. 331-384, 1980.

HAROLD, F. M.; BAARDA, J. R.; BARON, C.; ABRAMS, A. Dio 9 and chlorhexidine inhibition of membrane-bound ATPase and cation transport in *Streptococcus faecalis*. **Biochem Biophys Acta**, v. 183, p. 129-136, 1969.

HAUSEN, H. Predição de Cárie Dentária. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A Doença e seu Tratamento Clínico.** Ed. Santos. São Paulo, 2005.

HERZBERG, M. C. Streptococcal Infections, eds. Stevens, D.L. & Kaplan, E.L. (Oxford Univ. Press, New York), p. 333-370, 2000.

HJELJORD, L. G.; ROLLA, G.; BONESVOLL, P. Chlorhexidine-protein interactions. **J Periodontal Res Suppl**, v. 12, p. 11-16, 1973.

HOMER, K.A.; PATEL, R.; BEIGHTON, D. Effects of N-acetylglucosamine on carbohydrate fermentation by *Streptococcus mutans* NCTC 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1. **Infect Immun**, v. 61, p. 295-302, 1993.

HOSHINO, T.; KAWAGUSHI, M.; SHIMIZU, N.; HOSHINO, N.; OOSHIMA, T.; FUJIWARA, T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, v. 48, p. 195-199, 2004.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **J Pharm Pharmacol**, v. 16, p. 655-662, 1964.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J Pharm Pharmacol**, v. 18, p. 569-578, 1966.

HUGO, W. B.; RUSSELL, A. D. Types of antimicrobial agents. In A. D. Russell, W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe (ed.), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed., in press. **Blackwell Science**, Oxford, England, 1992.

HULL, P. S. Chemical inhibition of plaque. **J Clin Periodontol**, v. 7, n. 6, p. 431-42, 1980.

JENKINS, S.; ADDY, M.; WADE, W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. **J Clin Periodontol**, v. 15, n. 7, p. 415-424, 1988.

KEYES, P. H. The infections and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch Oral Biol**, v. 1, p. 304-320, 1960.

KEYES, P.H. Recent advances in dental research. Bacteriology. **Int Dent J**, v. 2, 443-464, 1962.

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

KOEPSSELL et al. Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. **J Biol Chem**, v. 200, 793-801, 1953.

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

KÖHLER, B.; PETERSSON, B. M.; BRATTHALL, D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. **Scand J Dent Res**, v. 89, p. 19-25, 1981.

KRASSE, B. **Risco de cárie: um guia prático para avaliação e controle**. Tradução: José Luiz Freire de Andrade. São Paulo: Quintessence, 113p., 1988.

KURAMITSU, H. K. Virulence factors of *mutans* streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, p. 159-176, 1993.

KUYYYAKANOND, T.; QUESNEL, L. B. The mechanism of action of chlorhexidine. **FEMS Microbiol Lett**, v. 100, p. 211-216, 1992.

LLENA-PUY, M.C. et al. Cariogenic oral flora and its relation to dental caries. **ASDC J Dent Child**, v. 67, p. 42-46, 2000.

LÖE, H.; SCHIOTT, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J Periodontal Res**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 1970.

LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R.; KARRING, G.; KARRING, T. Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. **J Periodontal Res**, v. 11, n. 3, p. 135-44, 1976.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, v. 50, p. 2118 – 2135, 1986.

LOESCHE, W. J.; STRAFFON, L. H. Longitudinal investigations of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. **Infect Immun**, v. 26, p. 498-507, 1979.

LONGWORTH, A. R. Chlorhexidine, p. 95–106. In W. B. Hugo (ed.). Inhibition and destruction of the microbial cell. **Academic Press Ltda**, London, England, 1971.

LOWE, J. B. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 5, p. 531-538, 2003.

LUOMA, H. The effects of chlorhexidine and fluoride combinations on the potassium, sodium and phosphorus content and acid production of cariogenic streptococci. **Archs oral Biol**, v. 17, p. 1431-1437, 1992.

MAGALHÃES, C. L. J. Risco e prevenção à cárie dentária: avaliação de um programa preventivo aplicado em uma clínica infantil. **RGO**, v. 56, n. 4, p. 367:373, 2008.

MALTZ, M. Cárie dental: fatores relacionados. In: PINTO, V.G. **Saúde Bucal Coletiva**. 4º ed. São Paulo: Editora Santos, Cap 11, p. 319-339, 2000.

MALTZ, M.; CARVALHO, J. Diagnóstico da doença cárie. In: KRIGER, L. **Promoção de Saúde Bucal**. 3:ed. São Paulo: Artes Médicas, Cap. 4, p. 69-87, 2003.

MARGOLIS, H. C.; MORENO, E. C. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. **J Dent Res**, v. 69, p. 606-613, Special Issue, 1990.

MARSH, P. D.; KEEVIL, C. W.; McDERMID, A. S.; WILLIAMSON, M. I.; ELLWOOD, D. C. Inhibition by the antimicrobial agent chlorhexidine of acid production and sugar transport in oral streptococcal bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 28, p. 233-240, 1983.

MARSH, P. D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res**, v. 7, p. 1431-1438, 1992.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, v. 8, p. 263-271, 1994.

MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dent Clin North Am**, v. 43, p. 599-614, 1999.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 204-211, 2004.

MARSH, P. D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38, S1, S11-S15, 2010.

MARSH, P.D.; MARTIN, M. *Oral Microbiology*, ed 3. London, Chapman & Hall, 1992.

MARSH, P.; MARTIN, M.V. **Microbiologia Oral**. ed 4. Editora Santos. São Paulo, 2005.

MARSH, P. D.; NYVAD, B. A. Microbiota Oral e Biofilmes Formados sobre os dentes. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A Doença e seu Tratamento Clínico**. Ed. Santos. São Paulo, 2005.

MATEE, M. I. N.; MIKX, F. H. M.; de SOET, J. S.; MASELLE, S. Y.; de GRAAFF, J.; van PALENSTEIN HELDERMAN, W. H. *Mutans* streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzanis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, p. 322-324, 1993.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Water-insoluble glucan sintesis by *mutans* streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 – to 30- month-old children. **J Dent Res**, v. 76, n. 6, p. 371-377, 2000.

MONCHOIS, V. et al. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroids* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ and $\alpha(1-3)$ linkages. **Gene**, v. 182, p. 23-32, 1996.

MONCHOIS, V.; WILLEMOT, R.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure – function relationships. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 23, p. 131 – 151, 1999.

MOOSER, G. Glycosidases and glycosyltransferases. The enzymes. Vol XX, p. 187-221. **Academic Press**, New York, 1992.

NAKANO, K. et al. Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Caries res**, v. 39, n. 4, p. 262-268, 2005.

NASCIMENTO, M. M.; LEMOS J. A. C.; ABRANCHES, J.; GONÇALVES, R. B.; BURNE, R. A. Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 6383-6390, 2004.

NEWBRUN, E. Conceitos atuais da doença cárie. In: **Cariologia**. São Paulo: Santos, Cap. 2, 17-49, 1988.

NYVAD, B.; KILLIAN, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. **Caries Res**, v. 24, p. 267-272, 1990.

OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; KUSHIYAMA, M.; KOGA, T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polimerase chain reation. **Oral Microbiol Immunol**, v. 15, p. 258 – 262, 2000.

OKADA, M.; SODA, Y.; HAYASHI, F.; DOI, T.; SUZUKI, J.; MIURA, K.; KOZAI, K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. **J Med Microbiol**, v. 51, p. 443 – 447, 2002.

OKADA, M.; SODA, Y.; HAYASHI, F.; DOI, T.; SUZUKI, J.; MIURA, K.; KOZAI, K. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. **J Med Microbiol**, v. 54, p. 661-665, 2005.

OKANO, M.; NOMURA, M.; HATA, S.; OKADA, N.; SATO, K.; KITANO, Y. et al. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. **Arch Dermatol**, v. 125, n. 1, p. 50-52, 1989.

ORLAND, F. J.; BLANEY, J. Experimental caries in germfree animals inoculated with enterococci. **J Am Dent Assoc**, v. 50, p. 259-272, 1955.

PILLON, F. L. Avaliação crítica dos recursos para o controle da placa bacteriana supragengival. In: Oppermann RV, Rösing CK, editores. **Periodontia: ciência e clínica**. São Paulo: Artes Médicas; p. 105-18, 2001.

- PINTO, V.G. **Saúde Bucal Coletiva**. Ed. Santos. São Paulo. 4 ed., 541 p., 2000.
- RADFORD, J. R.; HOMER, K. A.; NAYLOR, M. N.; BEIGHTON, D. Inhibition of human subgingival plaque protease activity by chlorhexidine. **Archs Oral Biol**, v. 31, n. 4, p. 245-248, 1992.
- RAITIO, M.; PIENIHÄKKINEN, K.; SCHEININ, A. Assessment of single risk indicators in relation to caries increment in adolescents. **Acta Odontol Scand**, v. 54, p. 113-117, 1996.
- RAVALD, N.; BIRKHED, D. Factors associated with active and inactive root caries in patients with periodontal disease. **Caries Res**, v. 25, p. 377-384, 1991.
- REDMO, E. I-M.; CARLSSON, P.; HAMBERG, K.; BRATTHAL, D. Tracing genotypes of *mutans* streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Oral Microbiol.Immunol**, v. 18, p. 24-29, 2003.
- REED, M. J. et al. Use of chlorhexidine gluconate to inhibit dental plaque accumulation in *Macaca speciosa*. **J. Periodont**, v. 48, n. 4, p. 219-220, 1977.
- ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The mechanism of dextransucrase action. Direction of dextran biosynthesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 165, p. 634-640, 1974.
- ROLLA, G.; LOE, H.; SCHIOTT, C. R. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. **Archs Oral Biol**, v. 16, p. 1109-1116, 1971.
- RÖLLA, G.; MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. **J Dent Res**, v. 54 Spec No B:B, p. 57-62, 1975.
- RUDD, P. M. et al. Glycosylation and the immune system. **Science**, v. 291, p. 2370-2376, 2001.
- RUSHTON, A. Safety of Hibitane. II. Human experience. **J Clin Periodontol**, v. 4, n. 5, p. 73-79, 1977.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SALEM, A. M.; ADAMS, D.; NEWMAN, H. N.; RAWLE, L. W. Antimicrobial properties of two aliphatic amines and chlorhexidine in vitro and in saliva. **Clin Periodontol**, v. 14, p. 444-7, 1987.

SANCHEZ-PEREZ, L.; ACOSTA-GIO, E. Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture media. **Arch Oral Biol**, v. 46, p. 49-55, 2001.

SATO, T.; HU, J. P.; OHKI, K.; YAMAURA, M.; WASHIO, J.; MATSUYAMA, J.; TAKAHASHI, N. Identification of *mutans* streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, p. 323-326, 2003a.

SATO, T.; MATSUYAMA, J.; KUMAGAI, T.; MAYANAGI, G.; YAMAURA, M.; WASHIO, J.; TAKAHASHI, N. Nested PCR for detection of *mutans* streptococci in dental plaque. **Letters in Appl Microbiol**, v. 37, p. 66-69, 2003b.

SCHEIE, A. A. et al. Microbial composition, pH-depressing capacity and acidogenicity of 3-week smooth surface plaque developed on sucrose-regulated diets in man. **Caries Res**, v. 18, n. 1, p. 74-86, 1989.

SEGRETO, V. A.; COLLINS, E. M.; BEISWANGER, B. B.; DE LA ROSA, M.; ISAACS, R. L.; LANG, N. P. et al. A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. **J Periodontol Res**, v. 21, Suppl 16, p. 23-32, 1986.

SHAH, D. S.; JOUCLA, G.; REMAUD-SIMEON, M.; RUSSEL, R. R. Conserved repeat motifs and glucan binding by glucansucrases of oral streptococci and *Leuconostoc mesenteroides*. **J Bacteriol**, v. 186, n. 24, p. 8301-8308, 2004.

SHIROZA, T.; UEDA, S.; KURAMITSU, H. K. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol**, v. 169, p. 4263-4270, 1987.

SIDEBOTHAN, R. L. (1974). Dextrans. In: MONCHOIS, V.; WILLEMOT, R.-M.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 31 – 151, 1999.

SIMPSON, C. L.; GIFFARD, P. M.; JACQUES, N. A. *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer independent glucosyltransferases. **Infect Immun**, v. 63, p. 609-621, 1995.

SILVA, A. C. B.; CRUZ, J. S.; SAMPAIO, F. C.; ARAÚJO, D. A. M. Detection of oral streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 648-651, 2008.

SMITH, R. G.; MORAN, J.; ADDY, M.; DOHERTY, F.; NEWCOMBE, R. G. Comparative staining *in vitro* and plaque inhibitory properties *in vivo* of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses. **J Clin Periodontol**, v. 22, n. 8, 613-617, 1995.

SUNDIN, B.; GRANATH, L.; BIRKHED, D. Variation of posterior approximal caries incidence with consumption in sweets with regard to other caries-related factors in 15-18 years-old. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 20, p. 76-80, 1992.

TAKAHASHI, M. et al. Role of N-glycans in growth factor signaling. **Glycoconj J**, v. 20, p. 207-212, 2004.

TALBOT, P. et al. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. **Biol Reprod**, v. 68, p. 1-9, 2003.

TATTAWASART, U.; HANN, A. C.; MAILLARD, J-Y.; FURR, J. R.; RUSSEL, A. D. Citological changes in chlorhexidine-resistant isolates of *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 145-152, 2000.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Textbook of clinical cariology**. 2.ed. Copenhagen: Munksgaard, 421p., 1994.

UEDA, S.; SHIROZA, T.; KURAMITZU, H. K. Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS 5. **Gene**, Gif-sur-Yvette, v. 69, p. 101-109, 1988.

VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J Dent Res**, v. 73, n. 3, p. 672-681, 1994.

YOSHIDA, A.; SUZUKI, N.; NAKANO, Y.; KAWADA, M.; OHO, T.; KOGA, T. Development of a 5' Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of Cariogenic Dental Pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4438-4441, 2003.

ZERO, D. T. Dental caries process. **Dent Clin North Amer**, v. 43, n. 4, p. 635-663, 1999.

ZHU, M.; TAKENAKA, S.; SATO, M.; HOSHINO, E. Extracellular polyssacharides do not inhibit the reaction between *Streptococcus mutans* and its specific immunoglobulin G (IgG) or penetration of the IgG through *S.mutans* biofilm. **Oral Microbiol Immunol**, v. 16, p. 54-56, 2001.

ZICKERT, C.; EMILSON, C. G.; KRASSE, B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v. 27, p. 861-868, 1982.

WEI, G-X.; CAMPAGNA, A. N.; BOBEK, L. A. Effect of MC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. **J Antimicrobiol Chemother**, v. 57, p. 1100-1109, 2006.

WINROW, M. J. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. **J Periodontal Res Suppl**, v. 12, p. 45-48, 1973.

DETECTION OF ORAL STREPTOCOCCI IN DENTAL BIOFILM FROM CARIES-ACTIVE AND CARIES-FREE CHILDREN

Andréa Cristina Barbosa da Silva^{1,2*}; Jader dos Santos Cruz^{2,3}; Fábio Correia Sampaio¹;
Demetrius Antônio Machado de Araújo²

¹Departamento de Odontologia Clínica e Social, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil; ²Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil; ³Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Submitted: October 23, 2007; Returned to authors for corrections: February 25, 2008; Approved: October 22, 2008.

SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

This work correlated the presence of oral streptococci in dental biofilm with clinical indexes of caries and oral hygiene in caries-active and caries-free children. *S. mutans* and/or *S. sobrinus* in the dental biofilm does not indicate a direct risk for developing dental caries.

Key words: dental caries; dental biofilm; oral streptococci; PCR; glucosyltransferases

It is well established that microorganisms have an important role in caries etiology (13). The oral streptococci, especially *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* have often been associated with dental caries in humans (18). Other microorganisms, such as *Streptococcus mitis* and *Streptococcus salivarius* have also been linked with the disease or absence of it. Their interplay within the dental biofilm is an important feature for the establishment and maintenance of the oral microflora and the development of a cariogenic dental plaque (16).

The detection and identification of oral streptococci in the dental biofilm is considered to be an important step for the understanding of dental caries. Several methods have been proposed to identify and differentiate oral streptococci: biochemical tests (24), immunologic and genetic methods with DNA probes (4), microbiologic methods (21), polymerase chain reaction (PCR) (8) and variations of this technique, such as real-time PCR (26) and nested PCR (22). The PCR method is faster, more sensitive and specific than the current microbiologic methods (9).

However, for clinical studies, the best predictor of dental caries is the past caries experience. This information is limited since the caries risk can be already established (2).

The aim of the present study was to correlate the presence of oral streptococci in the dental biofilm of children with different caries patterns, using specific primers to identify *S. mutans*, *S. sobrinus* and *S. salivarius* using the PCR technique.

Ten children were invited to participate in this study according to the following inclusion criteria: age ranging from 6–8 yr; studying in the same school and under same dietary pattern; presenting erupted permanent molars and different pattern of dental caries activity (DMFT/dmft > 0 or DMFT/dmft = 0). Children taking any medication during the study were excluded. The protocol was approved by the Ethical Board of the Health Science Center at the Federal University of Paraíba (protocol 231/04), and informed consent was obtained from the children's parents.

The clinical indexes obtained were: gingival bleeding index (GBI); simplified oral hygiene index (OHI-S) (6), and dental caries (DMFT and dmft) (25). The following salivary tests were also carried out: salivary flow rate, buffer capacity and oral streptococci counting (OSC).

The dental biofilm samples were obtained from the buccal surface of the first (deciduous or permanent) molar on the left side of the lower jaw, using sterile dentine spoons. The material

*Corresponding Author. Mailing address: Andréa C. B. Silva Departamento de Biologia Molecular/UFPB. Cidade Universitária. Castelo Branco. CEP: 58051-900. João Pessoa, PB, Brasil. Tel.: +55 83 3216 7436; fax: +55 83 3216 7787. E-mail: andreacsilva@gmail.com

was dispersed in sterile tubes containing brain heart infusion (BHI; Difco). After biofilm collection, the children were instructed to chew paraffin wax for 5 min, and then to spit into a sterile tube. The stimulated saliva and biofilm samples were kept on ice, transported immediately to the laboratory and examined within 2 h of collection.

The buffer capacity was obtained adding 1 ml of saliva to 3 ml of HCl (0.005%), and the final pH was measured.

The oral streptococci count was obtained after serially diluting the saliva samples with sterilized saline, inoculating on MS agar plates, and incubating at 37°C for 2 days in a 5% CO₂-enriched atmosphere. The microorganisms from saliva and dental biofilm samples were routinely cultured in brain heart infusion broth (BHI) (Difco, USA), mitis salivarius agar (MSA) (Difco, USA) and mitis salivarius agar supplemented with 440 mmol l⁻¹ sucrose, 39 mmol l⁻¹ potassium tellurite and 0.2 units ml⁻¹ of bacitracin (MSB).

Saliva samples were vortexed for 30 s and serially diluted (1:10, 1:100 and 1:100) in isotonic saline solution. The samples were then inoculated on MSB agar plates, in duplicate and incubated at 37°C for 2 d in a 5% CO₂-enriched atmosphere. Before the examination, the plates were left at room temperature for 24 h. To avoid bias, all plates were processed and examined by the same investigator. Colonies of oral streptococci were identified

morphologically and counted. The results are expressed as (CFU) ml⁻¹. The dental biofilm samples dispersed in BHI were vortexed for 30 s, plated in duplicate on agar plates of MS and MSB and incubated at 37°C for 2 d in a 5% CO₂-enriched atmosphere. Aliquots of oral streptococci from the dental biofilm samples were stored in tubes containing Skin Milk medium (Difco, USA).

The microorganisms (100 µl) stocked in Skin Milk were grown in 5 µl of BHI at 37°C for 24 h in a 5% CO₂-enriched atmosphere. DNA extraction from the microorganisms of the dental biofilm samples were carried out according to Buikema *et al.* (3), modified. The samples were kept at -20°C.

PCR was conducted using specific primers for the glucosyltransferase (GTF) enzyme to detect *S. mutans*, *S. sobrinus* and *S. salivarius* (Hoshino *et al.*, 2004 (8), modified). The PCR products were analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis, after staining with ethidium bromide. The gels were photodocumented using ImageMaster (Amersham Pharmacia Biotech, USA) for subsequent analysis.

The product size in each species was in accordance with the expected size. No results were found for *S. sobrinus*. *S. salivarius* was identified in 80% of dental biofilm samples cultivated in MSA and 55.5% in MSB. *S. mutans* was identified in 60% of the dental biofilm samples cultivated in MSA and 78% in MSB (Table 1).

Table 1. Oral streptococcal species detected by PCR from dental biofilm samples cultivated in medium MSA and MSB.

Caries risk	High caries activity (DMFT/dmft>0)					Low caries activity (DMFT/dmft=0)				
	1	3	5	6	7	2	4	8	9	10
Patient no.*										
Age	7	7	8	7	7	7	6	7	7	7
dmf-t**	4	3	9	6	2	0	0	0	0	0
DMF-T†	1	4	4	4	1	0	0	0	0	0
OHI-S‡	1.5	1.83	2.0	1.8	1.16	2.16	0.83	1.16	1.33	1.16
GBI§	6.25	2.17	8.33	6.8	5.00	7.29	1.31	6.25	4.76	1.08
MSA										
<i>S. mutans</i>	+§§	+	+	+	+	-§§	+	-	-	-
<i>S. sobrinus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. salivarius</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
MSB										
<i>S. mutans</i>	+§§	+	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>S. sobrinus</i>	-§§	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. salivarius</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+

*Dental biofilm samples obtained from ten 6–8-year-old children.

**dmf-t, decayed and filled deciduous tooth index.

†DMF-T, decayed and filled permanent tooth index.

‡OHI-S, simplified oral hygiene index.

§GBI, percentage of gingival bleeding index.

§§+, detected in PCR; -, not detected in PCR.

#There was no growth of microorganisms in the dental biofilm sample cultivated in MSB from patient 2.

There was no clear relationship between caries experience and caries activity as well as oral streptococci counting (OSC). Some studies found a relationship between high OSC (above 10^6 UFC/ml) and high caries indexes (5,15). On the other hand, Loesche and Straffon (12) demonstrated that caries can occur in the absence of *S. mutans* and Matee *et al.* (14) observed that the level of oral streptococci in the saliva of children cannot predict future caries.

Correlations between salivary tests (including OSC) and patients with high caries activity and low caries activity were not observed. These findings are in accordance with Sundin *et al.* (23) who also found a weak or non-existent relationship between these variables. However, Ravald and Birkhed (20) demonstrated that individuals with low salivary flow rate have a higher predisposition to cariogenic activity.

In the present work, MSB medium selected the microorganisms of the *mutans* group (*S. mutans* and *S. sobrinus*) and *S. salivarius* of the *salivarius* group. These findings are in accordance with Yoo *et al.* (27) who concluded that MSB medium is not specific for selecting streptococci of the *mutans* group, suggesting that a new selective medium is required for reliable isolation of *mutans* streptococci.

In this work, *S. mutans* and *S. salivarius* were identified in the dental biofilm of patients with HCA and LCA (Table 1). The association between *S. mutans* with *S. sobrinus* and carious lesions has been observed previously. The differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* is important due to their different behavior in the initial colonization phase and different virulence mechanism (11). Considering the cariogenicity of *S. salivarius*, few studies related this bacterium with dental caries (1).

S. sobrinus is frequently present at a lower level than *S. mutans* (17) due to its inability to carry *N*-acetylglucosamine. This is an energy-requiring process which depletes the intracellular levels of phosphoenolpyruvate (7) and reduces the energy inside the microorganism that can be used for other purposes. MSB medium can also inhibit the growth of *S. sobrinus*. Pereira *et al.* (19) demonstrated that *S. mutans* has ability to inhibit plaque formation by *S. sobrinus* and recolonize surfaces. Individuals with increased numbers of *mutans* streptococci and lactobacilli were associated with increasing prevalence of caries (10).

Few studies have evaluated the prevalence of *S. salivarius* in dental biofilm. In general, this microorganism is identified on the tongue. In this study, this microorganism was frequently identified in cultivated samples of dental biofilm in MSA and MSB, as well in patients with HCA and LCA. Similar findings were observed by Hoshino *et al.* (8), who identified this microorganism in 9 of the 10 salivary samples analyzed in caries-free patients, and patients with high caries indexes (DMFT and dmft). *S. salivarius* showed a high prevalence in dental biofilm samples in this study, and it can cooperate with *S. mutans* to

form a cariogenic dental plaque. This must be investigated further in future studies.

In spite of the low number of patients in our study, it could be expected that if a direct and strong correlation between OSC and dental caries takes place, this relationship could be differentiated between these carious risk groups. The unclear relation of specific microorganisms and clinical caries parameters support the hypothesis that other factors are necessary to be operating for caries development (e.g. lack of oral hygiene and/or a sugar rich diet). Nevertheless, the multifactorial etiology for dental caries does not invalidate the use of PCR for microorganism detection since this technique can be a reliable tool for bacteria identification in the complex biofilm environment. Finally, it can be concluded that the presence of *S. mutans* and/or *S. sobrinus* in the dental biofilm does not indicate a direct risk for the development of dental caries.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the technical assistance of Amely Branquinho Martins and Teresa Cristina S. L. Grisi. We are also thankful to Itácio Padilha and Marcela Lins. This work was supported by CAPES and CNPq.

RESUMO

Detecção de estreptococos orais em biofilme dental de crianças cárie-ativas e livres de cárie

Este trabalho correlacionou a presença de estreptococos orais no biofilme dental com índices clínicos de cárie dentária e higiene oral em crianças com alta e baixa atividade de cárie. *S. mutans* e/ou *S. sobrinus* no biofilme dental não significa o imediato desenvolvimento de lesões cariosas.

Palavras-chave: cárie dentária; biofilme dental, estreptococos orais; PCR; glicosiltransferases.

REFERENCES

1. Brailsford, S.R.; Shah, B.; Simons, D.; Gilbert, S.; Clark, D.; Ines, I.; Adams, S.E.; Allison, C.; Beighton, D. (2001). The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J. Dent. Res.*, 80: 1828-1833.
2. Bratthall, D. (1996). Dental caries: intervened-interrupted-interpreted. Concluding remarks and cariography. *Eur. J. Oral Sci.*, 104: 486-491.
3. Buikema, W.J.; Klingensmith, J.A.; Gibbons, S.L.; Ausubel, F.M. (1987). Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae* *nifB* genes. *J. Bacteriol.*, 169: 1120-1126.
4. Conrads, G. (2002). DNA probes and primers in dental practice. *Clin. Infect. Dis.*, 35(Suppl 1): 72S-77S.
5. Fujiwara, T.; Sasada, E.; Mima, N.; Ooshima, T. (1991). Caries prevalence and salivary *mutans* streptococci in 0-2-years-old children of Japan. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 19: 151-154.

6. Greene, J.C.; Vermillion, J.R. (1964). The simplified oral hygiene index. *J. Am. Dent. Assoc.*, 68: 7-13.
7. Homer, K.A.; Patel, R.; Beighton, D. (1993). Effects of N-acetylglucosamine on carbohydrate fermentation by *Streptococcus mutans* NCTC 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1. *Infect. Immun.*, 61: 295-302.
8. Hoshino, T.; Kawagushi, M.; Shimizu, N.; Hoshino, N.; Ooshima, T.; Fujiwara, T. (2004). PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gff* genes. *Diagn. Microb. Infect. Dis.*, 48: 195-199.
9. Igarashi, T.; Yamamoto, A.; Goto, N. (1996). Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.*, 5: 294-298.
10. Köhler, B.; Bjarnason, S. (1992). *Mutans* streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 15 to 16-year olds in Goteborg. Part II. *Swed. Dent. J.*, 16: 253-259.
11. Loesche WJ. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, 50: 2118-2135.
12. Loesche, W.J.; Straffon, L.H. (1979). Longitudinal investigations of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect. Immun.*, 26: 498-507.
13. Marsh PD. (2000). Role of the oral microflora in health. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 12: 130-137.
14. Matee, M.I.N.; Mikx, F.H.M.; Soet, J.S.; Maselle, S.Y.; Graaff, J.; van Palenstein Helderma, W.H. (1993). *Mutans* streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzanis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 8: 322-324.
15. Mattos-Graner, R.O.; Smith, D.J.; King, W.F.; Mayer, M.P. (2000). Water-insoluble glucan synthesis by *mutans* streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J. Dent. Res.*, 76: 371-1377.
16. Nyvad, B.; Kilian, M. (1990). Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.*, 24: 267-272.
17. Okada, M.; Soda, Y.; Hayashi, F.; Doi, T.; Suzuki, J.; Miura, K.; Kozai, K. (2002). PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *J. Med. Microbiol.*, 51: 443-447.
18. Okada, M.; Soda, Y.; Hayashi, F.; Doi, T.; Suzuki, J.; Miura, K.; Kozai, K. (2005). Longitudinal study of dental incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *J. Med. Microbiol.*, 54: 661-665.
19. Pereira, C.V.; Pereira, L.J.; Gonçalves, R.B.; Höfling, J.F. (2006). *In vitro* bacterial plaque suppression and recolonization by *S. mutans* and *S. sobrinus*. *Braz. J. Microbiol.*, 37:20-25.
20. Raval, N.; Birkhed, D. (1991). Factors associated with active and inactive root caries in patients with periodontal disease. *Caries Res.*, 25: 377-384.
21. Sanchez-Perez, L.; Acosta-Gio, A.E. (2001). Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture media. *Arch. Oral Biol.*, 46: 49-55.
22. Sato, T.; Matsuyama, J.; Kumagai, T.; Mayanagi, G.; Yamaura, M.; Washio, J.; Takahashi, N. (2003). Nested PCR for detection of *mutans* streptococci in dental plaque. *Lett. Appl. Microbiol.*, 37: 66-69.
23. Sundin, B.; Granath, L.; Birkhed, D. (1992). Variation of posterior approximal caries incidence with consumption in sweets with regard to other caries-related factors in 15-18 years-old. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 20: 76-80.
24. Whiley, R.A.; Beighton, D. (1998). Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, 13: 195-216.
25. WHO. (1987). *Oral health surveys: basic methods*. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 53.
26. Yano, A.; Kaneko, N.; Ida, H.; Yamaguchi, T.; Hanada, N. (2002). Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 217: 23-30.
27. Yoo, S.Y.; Kim, P.S.; Hwang, H.K.; Lim, S.H.; Kim, K.W.; Choe, S.J.; Min, B.M.; Kook, J.K. (2005). Identification of non-*mutans* streptococci organisms in dental plaques recovering on mitis-salivarius bacitracin agar medium. *J. Microbiol.*, 43: 204-208.

Influence of chlorhexidine on morphology and on glucosyltransferase genes expression in *Streptococcus mutans* UA159

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Andrea Cristina; Federal University of Paraiba, Department of Clinical and Social Dentistry Stipp, Rafael; University of Campinas, Department of Oral Diagnosis Mattos Graner, Renata; University of Campinas, Department of Oral Diagnosis Sampaio, Fabio; Federal University of Paraiba, Department of Clinical and Social Dentistry Araújo, Demétrius Antônio; Federal University of Paraiba, Department of Molecular Biology
Keywords:	Dental plaque, Antimicrobial activity, Drug action, Glucosyltransferases

SCHOLARONE™
Manuscripts

Original article

Title: Influence of chlorhexidine on morphology and on glucosyltransferase genes expression in *Streptococcus mutans* UA159

Short title: Effect of chlorhexidine on *Streptococcus mutans*

Andréa Cristina Barbosa da Silva^{1,2}; Rafael Nóbrega Stipp³, Renata de Oliveira Mattos Graner³; Fábio Correia Sampaio¹; Demetrius Antônio Machado de Araújo².

¹*Department of Clinical and Social Dentistry, Health Science Center, Brazilian Northeast Network on Biotechnology Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.*

²*Department of Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Brazilian Northeast Network on Biotechnology Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.*

³*Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brazil.*

Key words: Dental plaque, Antimicrobial activity, Drug action, Glucosyltransferases.

*Corresponding author: Fábio Correia Sampaio. Department of Clinical and Social Dentistry, Health Science Center, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária. Castelo Branco CEP: 58051-900. João Pessoa, Paraíba, Brazil. Tel.: +55 83 3216 7795; fax: +55 83 3216 7409. E-mail: fcsampa@gmail.com

Synopsis

Objectives: The aim of the present study was to investigate the antibacterial activity of chlorhexidine gluconate (CHX) against *in vitro* planktonic and biofilm *Streptococcus mutans* cells in a dose- and time-dependent manner.

Methods: Real-time reverse transcription-PCR was used to quantify the relative levels of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* transcription of *S. mutans* in the presence of CHX. The activity of CHX in the initial biofilm structure for 2 and 4 h and morphological alterations in planktonic cells, under a range of CHX concentration, was examined by Scanning Electron Microscopy (SEM).

Results: In planktonic cells, exposition to CHX 4.5mg/L increased *gtfC* and *gtfD* expression by 11-fold and 4-fold ($p < 0.01$), respectively. In biofilm, expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* were reduced (< 1.6 -fold $p < 0.01$) at concentrations above 500mg/L. Cell surfaces did not show any obvious change when planktonic cells were exposed to CHX at 4.5 mg/L for 2 or 4h, but after 6 h, several wilted *S. mutans* cells with lost intracellular material could be observed. A decrease in the cells' chain length and matrix was found when the initial biofilm was exposed from 1.1 mg/L to 4.5 mg/L of CHX, while 1200 mg/L and 2000 mg/L caused extensive precipitation of unknown material on the slide.

Conclusions: The CHX effects against bacteria depend on the kind of growth organization and the concentration/time of exposure to the drug. CHX may affect cell walls and intervene with mechanisms of the biofilm formation, and at sub-lethal concentrations, affect the expression of *gtfs*, which may disturb the biofilm.

Introduction

Chlorhexidine (CHX) is successfully used in many formulations to control the formation of dental biofilm¹. As a cationic biguanide, the drug binds to negatively-charged surfaces² and has a broad spectrum of antimicrobial activity³. However, its clinical application is limited because it has a bitter taste and can cause teeth to stain on frequent use⁴.

This drug can be used as "shock treatment" in patients with high risk and caries activity, since it greatly decreases the amount of micro-organisms existing in the biofilm, including aciduric and acidogenic bacteria associated with dental caries, by applying CHX professional associated with a prophylactic regimen containing oral hygiene instruction, dietary advice, professional dental prophylaxis and topical fluoride application⁵.

CHX at high concentrations is bactericidal, causing lethal damage to the bacterial membrane; at sub-lethal concentrations, CHX can interfere with the metabolism of oral bacteria by inhibiting: (a) sugar transport and acid production in cariogenic streptococci, (b) various membrane functions in streptococci, including inhibiting enzymes responsible for maintaining an appropriate intracellular pH, and (c) a protease (gingipain) in the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*⁶.

Despite the CHX being the "gold standard" among the topical plaque control products of dentistry⁷, understanding all the implications for its clinical use and having a better comprehension about its mechanism of action on *Streptococcus* species is relevant for establishing clinical protocols.

Streptococcus mutans is the main causative agent of human dental caries, mainly as a result of its ability to adhere to teeth surfaces and acidogenicity^{8,9}. Such bacteria

produce three glucosyltransferases, GtfB, GtfC and GtfD, which synthesize soluble and insoluble glucan polymers from sucrose¹⁰. These polysaccharides enhance the colonization of cariogenic bacteria and promote the formation of dental plaque on teeth surfaces¹¹.

The understanding of the structure of the dental plaque as a biofilm sheds light on the understanding and clinical relevance of CHX usage¹². Studies have already proved that CHX *in vitro* and *in vivo* conditions has been an efficient plaque control^{13,14,15}; however few studies have focused on structural or molecular changes that can occur in cells and/or biofilm matrix.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial effects of CHX gluconate on *S. mutans* planktonic or biofilm cells in a dose- and time-dependent manner. Morphological changes in cells and/or biofilm matrix were examined using Scanning Electron Microscopy (SEM), and by real-time quantitative PCR (RT-PCR), expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD*.

Materials and methods

Bacteria, growth conditions and chemicals

S. mutans UA159 was grown in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, MD, USA) at 37°C, in an atmosphere enriched with 10% CO₂. Chlorhexidine digluconate (20% aqueous solution, Cat. #C9394) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

CHX MIC and MBC assay for planktonic cells (Plk)

The MIC and the MBC for Plk were determined by overnight-standard 96-well plate microdilution method and agar plating¹⁶. Two-fold dilutions of drug were prepared in each test well with BHI, with CHX concentrations ranging from 0.56 mg/L to 72 mg/L. Aliquots of 20 μ L containing bacterial suspension, adjusted spectrophotometrically to match the optical density of $A_{550nm}=0.5$, were added to each 180 μ L of drug-containing culture medium. Control wells included culture medium only, culture medium and CHX and wells without CHX. Plates were closed and incubated for 18 h at 37°C in an atmosphere enriched with 10% CO₂. After incubation, the MIC was determined visually. MIC was defined as the lowest drug concentration in which growth-turbidity was not observed. Assays were repeated three times in duplicate. Viable counting from control wells and from test wells was performed onto BHI agar plates to determine MBC. MBC was defined as the lowest drug concentration in which no colony forming units were observed on the plate.

CHX MBC assay for biofilm cells

Biofilm analyses were formed in 20 mm diameter, 15 mm deep polystyrene multidishes (six wells plates), by incubation of 20 μ L of bacterial suspension ($A_{550nm}=0.5$) and 5 mL of BHI supplemented with 0.1 % sucrose. After 18 h of growth, CHX was added directly to media-containing wells at final concentrations of 50 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L, 800 mg/L or 1000 mg/L. Wells which didn't receive CHX were set as control. Whole plate was closed and homogenized on an orbital mixer (80rpm) for 60s, and incubated for additional 5 min at 37°C in an atmosphere enriched with 10% CO₂. After, the medium was aspirated and biofilm was washed three times with 5ml NaCl 0.9% solution (saline) to remove non-adherent cells. Whole biofilm layer was dislodged with the aid of a cell disrupter (Lifter Cell/3008; Costar, Corning, NY) in presence of 2 mL saline. Part of dislodged biofilm suspension was subjected to expression analysis

(below) and part (50 μ l) subjected to dilution for viable counting onto BHI agar plates aiming quantifies MBC in biofilm (MBC-b). MBC-b was defined as the lowest drug concentration after exposure that prevented colony forming units growing on agar medium. Assays were performed in duplicate and repeated three times.

Analysis of *gtf* expression in planktonic cells under CHX exposition challenge

The expression levels of all genes were normalized by amplification of 16S rRNA of *S. mutans* as an internal standard. Overnight *S. mutans* broth culture was inoculated into 300ml of pre-warmed BHI and let growth until reaches $A_{550nm}=0.3$. Homogenized culture was then distributed into 20ml aliquots in new tubes, and exposed to sub-lethal doses of CHX at 1.1 mg/L, 2.2 mg/L and 4.5 mg/L each. Tubes which received the same volume of saline instead of CHX were set as control. All tubes were incubated for 2, 4 and 6 h at 37°C, 10%CO₂. After, suspensions were quickly cooled on ice and centrifuged at 5500g at 4°C for 4 min. Cells were washed in cold saline and stored with 220ul of 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE) at -80°C until use. Aliquots of cultures at each time point were subjected to viable counting onto BHI agar plates.

Analysis of *gtf* expression in biofilm cells under CHX challenge

Biofilms exposed to CHX at 100 mg/L, 500 mg/L and 800 mg/L, as described above, where selected to analysis of *gtf* expression. Dislodged cell suspensions were centrifuged, washed in cold saline and stored with 220 ul of TE at -80°C, until use.

RNA isolation from planktonic cells and biofilms

Total *S. mutans* RNA from either planktonic cells or biofilms was extracted and purified using an RNeasy RNA isolation column (Qiagen-Sciences, MD). Briefly, frozen cells were mechanically disrupted with 0.16 g of 0.1 mm diameter Zirconium Beads

(Biospec, OK, USA) on a Mini-beadbeater (Biospec), at maximum power (3 cycles of 30s with 60s on ice). Further RNA purification, followed by digestion with on-column RNase-free DNase I, was performed as recommended by the manufacturer. To remove small traces of remaining DNA, purified RNA was treated with DNase I (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA sample concentrations were determined at $A_{260\text{nm}}$ (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) and integrity by 1.2% formaldehyde agarose gels stained with ethidium bromide.

Reverse transcription and RT-PCR

Reverse transcription of experimental samples together with negative controls was carried out with 1 μg RNA using Superscript III RT (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as previously described¹⁷. After the reaction, water was added, so the product concentration was relative to RNA 10ng/ μl . Controls for cDNA synthesis included samples without RNA template and samples without reverse transcriptase.

Quantification of cDNA was performed using the Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) and primers described (Table 1)¹⁷. Each reaction mixture (25 μL) contained 1 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.6 μM of each appropriate forward/reverse primer and 3 μL of cDNA sample (30ng relative RNA). Cycling conditions included initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by a 50 cycles amplification, consisting of denaturation at 95°C for 15s, annealing at 54°C for 15s and extension at 72°C for 30s each. Controls included reaction mixtures without cDNA template, to rule out primer dimers formation or presence of contaminating DNA. A standard DNA amplification curve starting from 300ng to 0.003ng (10-fold dilutions) and a melting-point product curve were obtained for each primer set. Assays were performed in duplicate with three or more independent RNA samples.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Planktonic cells

The effects of CHX on cell morphology were investigated by SEM. Planktonic cells were grown in presence of CHX (1.1 mg/L, 2.2 mg/L, 4.5 mg/L) or not (control) for 2, 4 and 6 h. Cultures were centrifuged, washed with saline two times and re-suspended with saline in original's volume. Bacterial suspensions (50ul) were applied on cover slip surfaces and subjected to fix process with 55°C (60min) and 2.5% glutaraldehyde (30min). Glutaraldehyde excess was removed, and cells were dehydrated within ethanol series (50% to 100%) for 20min each. Finally, ethanol was removed and cover slips dried at room temperature. Samples were sputter-coated with gold and analyzed with a scanning electron microscope as recommended by manufacturer (JEOL, JSM, 5600LV, Japan).

Biofilms

The effects of CHX on the initial phases of biofilm formation were investigated by SEM. Sterile glass cover slips ($\text{\O} = 13$ mm, GLASTEC, Brazil) were placed in each well of a 24-well plate. BHI medium (1.5ml) supplemented with 0.1% sucrose containing CHX (1.1 mg/L, 4.5 mg/L, 72 mg/L, 1200 mg/L or 2000 mg/L) or not (control) were transferred to wells. Aliquots of 50 μ L of bacterial suspension ($A_{550\text{nm}} = 0.5$) was then added, mixed, and incubated at 37°C, 10% CO₂ for 2 or 4 h. Biofilm grown on slides was washed three times with PBS to remove non-adherent cells and processed for SEM analysis as described above.

Statistical analysis

Relative expression was calculated by Pfaffl mathematical model¹⁸. Briefly, cycle threshold values of expression levels (C_t) obtained from dilution curves were used to determinate qPCR efficiency for each primer set. Each *gtf* gene of treated cells was normalized to the 16S rRNA gene (internal control)¹⁷. These values were then compared to those from the non-treated, 16S-normalized control, to determine the changes in *gtf* genes expression. Using C_t values, statically significance was obtained at $p < 0.01$ or $p < 0.05$, using ANOVA Dunnett Bilateral test, under BioEstat 5.0 free software.

Results

Antimicrobial effects of CHX

CHX MIC and MBC for planktonic cells were 2.2 mg/L and 18 mg/L, respectively, while CHX MBC for biofilm (MBC_b) was 800 mg/L (Figure 1). Planktonic cells exposed to 4.5 mg/L CHX and 9 mg/L CHX reduced the bacterial counts almost by 6- and 20-fold, whereas 18 h biofilm counts were consistently reduced (2.5-fold or more) only in concentrations above 500 mg/L (Figure 1).

Effect of CHX on 16S gene expression

C_t values of 16S rRNA did not change in experiments with cells from biofilms [mean C_t 13:24 (\pm 0:48)]. C_t values of 16S rRNA showed a higher coefficient of variation (6.05%) in the group with the highest concentration of CHX (C3: 800 mg/L) than with other groups (C1: 100 mg/L and C2: 500 mg/L) (<3.0%) (Figure 2).

The values of C_t 16s rRNA gene did not vary in the experiments with planktonic cells [mean c_t 13:24 (\pm 0.48)]. In terms of exposure to CHX or not, there was less than a 7% variation. Considering only the control and minor concentrations (C1: 1.1 mg/L and

C2: 2.2 mg/L), this variation was less than 5%. The greatest change was observed in experiments intra-group C3: 4.5 mg/L, where exposure to CHX has generated a 7% range (data not shown). Thus, the 16S gene can be successfully used as a housekeeping gene (reference gene) on these conditions.

Effect of CHX on *gtfs* genes expression

Regarding the expression of *gtfs* in planktonic cells, CHX increased *gtfC* ($p < 0.05$) and *gtfD* ($p < 0.01$) expression only in cell cultures with 6 h growth, at C3: 4.5 mg/L concentration (Figure 3). In the biofilm environment, the expression of *gtfB* and *gtfD* was reduced in C2: 500 mg/L and C3: 800 mg/L concentrations, while there was a decrease of *gtfC* expression only C2: 500 mg/L concentration, when compared to control ($p < 0.01$) (Figure 4).

SEM analysis

SEM analyses of planktonic cells and biofilm exposed or not to CHX are shown in Figures 5 and 6. Several assays were performed for these morphological analyses and the results presented are representative of three independent experiments. Cells surfaces did not show any obvious change when cells are exposed to range of concentrations of CHX (1.1, 2.2 or 4.5 mg/L) for 2h (data not shown). However, as demonstrated by SEM (Fig. 5), after 4 or 6h of exposition at under-MBC (4.5 mg/L), several wilted *S. mutans* cells and cells with rupture of membrane and, as a result, lost a substantial amount of cytoplasmic material, could be verified. SEM analyses of initial control biofilms and those treated with CHX are shown in Fig. 6, where a decreasing in the cells chain length and matrix were found when the biofilms were exposed from 1.1 mg/L to 4.5 mg/L of drug, while 1200 mg/L and 2000 mg/L caused extensive precipitation of unknown material on the slide (data not shown).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report to investigate the effects of CHX on the glycosyltransferases gene expression from planktonic and biofilm-organized *S. mutans*, as well as to examine and relate its effect on cells surface and on biofilm structure.

In this study the MICs and MBCs of CHX against micro-organisms were determined in 2, 4 and 6 h planktonic cultures, exposed to the drug since they started growing, evaluating the growth kinetics under CHX effect. The technique used was the microdilution¹⁶, and the MIC and MIB found had 2.2 mg / L and 18 mg / L, respectively. Similar results were found for MIC by some authors as Jarvinen et al¹⁹, 1991, Sampaio et al, 2009²⁰; Fani et al, 2009²¹.

The reason for the variations found in the values of MIC reported is probably due the bacteriological culture media composition that can affect the concentration of CHX available for interaction with the bacterial cells²². According to Russell and Day, (1993)²³, CHX in high concentrations, binds to proteins in culture media, and their activity is pH dependent and is reduced in the organic matrix presence. In this study, CHX used in tests with planktonic cells (low concentrations) was diluted in BHI. In tests with the biofilms, which required higher concentrations of the drug, CHX was diluted in sterile distilled water.

The MBC for biofilms were determined according to methodology by Tam et al (2006)²⁴, modified in the present study. The MBC determined for 18h biofilms was 800 mg/L. Wei et al (2006)²⁵, obtained MIC and MBC of 0.625 mg/L and > 10 mg/L, respectively, in *S. mutans* biofilms, but there were some differences in study: 1) the

bacterium used was *S. mutans* GS-5; 2) The BHI medium did not have sucrose; 3) the method used was the microdilution method, similar to the MIC assay for planktonic cells, in 96-well polystyrene tissue culture plate; and 4) Incubation at 37°C for 24h.

Likewise, as discussed above with planktonic cells, it is difficult to compare the results of MIC and MBC of CHX in *S. mutans* biofilm, since different methodologies can affect outcomes, such as the type and quantity of bacteria present in biofilms, whether it is mono-or multispecies, or the type of vehicle in which CHX is diluted.

Sub-MIC and MIC concentrations were selected for the SEM experiments and expression analysis in 18h biofilms and planktonic cells, since this drug at higher concentrations causes cell death. Eighteen hours biofilms growth was used in the experiments to observe the microbial behavior even in the stationary phase. The biofilms were exposed to the drug for a period of five min, to mimic the oral cavity environment when exposed to CHX during fast mouthwash with the drug.

S. mutans, when organized in biofilms, has different properties than its planktonic form. Biofilms have a more tolerant phenotype to antimicrobial agents, stress and host defenses than planktonic cultures, making them difficult to treat²⁶. This means that the agents' effectiveness used in prevention of dental caries, specifically targeted to combat cariogenic pathogens, should be evaluated in biofilms rather than in traditional liquid cultures²⁷. The patterns of gene expression in biofilms are also differentiated from those of planktonic cells²⁸. Since the biofilms differ significantly from planktonic cells, it is necessary to make tests under both conditions in order to better understand the effect of CHX on these cells.

In this study, methods of RNA extraction from planktonic cells and biofilms were similar which makes possible the direct comparison of these different conditions

of the same bacterial micro-organism. The polysaccharides elimination of the biofilm, as a prior step to extraction^{29,30}, was not necessary in our *in vitro* conditions.

Our results indicated that the expression of 16S *S. mutans* remained stable when exposed to CHX environment regardless whether it is in planktonic or in biofilms. This suggests that the 16S gene can be used as a reference gene on analysis of expression in the two conditions described above. However, there was an increase variation of 16S rRNA gene expression, at concentrations 4.5 mg/L and 800 mg/L in planktonic cells and biofilms, respectively (Figure 2).

Thus, the use of 16S rRNA as reference gene in planktonic cultures at concentrations above 4.5 mg/L, and in biofilms of 800 mg/L should be validated to observe if this expression is constant, or has its variance increased. This gene has been successfully used as reference gene in studies with *S. mutans* in biofilm and planktonic cells^{24,28, 17, 31}.

The effect of antimicrobial agents in gene expression that are heavily involved in biofilm formation is of particular interest to dentistry³². Tam et al (2006)²⁴ observed that iodine at sub-concentrations demonstrates molecular effects that are highly associated with biofilm formation. Koo et al (2006)³¹ demonstrated that apigenin affect the *gtfs* expression on *S. mutans* UA159.

Our results suggest that the effect of CHX in the *gtfs* of *S. mutans* UA 159 is dependent upon the type of growth organization and the concentration/time of exposure to the drug. According to our findings, this drug inhibited the *gtfs* of *S. mutans* organized as biofilm but increased the *gtfs* expression in planktonic cells. This is a clear indication that CHX may have an adverse effect on the adhesion process of these cells

on the tooth surface, which is relevant for clinical purposes for controlling oral biofilms development *in vivo*.

According to Wade (2010)³³, high concentrations of CHX kills the cells, and this is not interesting for the balance of microbiota in the biofilm. Successful antimicrobial agents are able to maintain the oral biofilm at levels compatible with oral health but without disrupting the natural and beneficial properties of the resident oral microflora³⁴. Thus, in biofilms, low concentrations of CHX may have an anticariogenic effect by inhibiting the expression of enzymes associated with virulence of *S. mutans*. In addition, reduced concentrations of CHX mouthwash in the mouth could also reduce some of the adverse effects of drugs (e.g., unpleasant taste, tooth staining and taste alteration)³⁵.

Radford et al (1992)³⁶, demonstrate that inhibition of biofilm formation *in vivo* can occur when using sub-MIC concentrations of CHX by unknown mechanisms. However, it is possible that the reduction in the formation of the matrix of the biofilm exposed to low concentrations of CHX (Figure 7) may be related to the affinity of CHX with proteins, as well as the ability to reduce the expression of some GTFs (Figures 3 and 4). Thus, the consequent reduction in the synthesis of glucan inhibits the formation of the biofilm matrix.

According to Dunne (2002)³⁷, the antibiotic only kills outer layers of bacteria of the biofilm, leaving the healthy microorganisms in the inner layers, allowing the growth of these bacteria later when CHX is not present. It is also noteworthy to understand that possible conformational changes in biofilm structure (e. g. water channels) may contribute to the diffusion of CHX further into deeper layers of the bilfilms³⁸. This variable was not evaluated in our study but it might explain the unexpected difference in

gtf expression in planktonic and biofilm forms since viable cells might be protected by the low diffusion rate of the drug in biofilm matrix.

In this work, planktonic cells, when exposed to higher concentrations of the drug, suffered rupture of membrane (Figure 6). Tattawasart et al (2000)³⁹, found similar results on the effect of CHX, however, in *Pseudomonas stutzeri* species sensitive to the drug. This disruption of the membrane can be explained by the fact that CHX, positively charged, binds tightly to the membranes of the bacteria because of its opposite negative charge, causing the disruption of membrane perturbation by these sites⁴⁰. Under such microbial stress, it is expected that enzyme expression can be altered as suggested by figures 3 and 5 (concentration 4.5 mg/L).

CHX reduces the fluidity of cell membranes in two ways: 1) at low concentrations affects the cell membrane osmoregulatory metabolic ability⁴¹, and at high concentrations, according to Longworth (1971)⁴² and Chawner and Gilbert (1989a, b, c)^{43,44,45}, causes the membrane to adopt a crystalline state liquid, losing its structural integrity and preventing the loss of cellular materials. This loss of intracellular material in *S. mutans* was observed in initial biofilms of 2 and 4 h when exposed to higher concentrations of CHX: 1200 mg/L and 2000 mg/L (data not shown).

In conclusion, our findings indicate that CHX effects against bacteria depended on the kind of growth organization and the concentration/time of exposure to the drug. CHX may affect cell walls and intervene with mechanisms of the biofilm formation, and at sub-lethal concentrations, reduces the expression of some *gtfs* in *S. mutans* biofilms, which may exert an anticariogenic effect. From the clinical point of view, the purpose of using mouthwashes containing antimicrobial, is not the cell death, but the

control or elimination of mechanisms of virulence of these micro-organisms in biofilms, as occurs in the oral cavity.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. 07/56100-2), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ, Proc 483794/2006-6 and Proc 472988/2009-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). RNS was supported by FAPESP (06/55933-8) and CAPES (4510-07-0). DAMA and FCS are CNPq fellows and ACBS is CAPES fellow.

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Lang NP; Brex MC. Chlorhexidine gluconate, an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *Journal of Periodontal Research* 1986; **21**, Suppl 16, 74-89.
2. McDonnell G, Russel AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol* 1999; **12**:147-179.
3. Salem AM, Adams D, Newman HN, Rawle LW. Antimicrobial properties of two aliphatic amines and chlorhexidine in vitro and in saliva. *Clin Periodontol* 1987; **14**:4447.
4. Kidd EAM. Role of chlorhexidine in the management of dental caries. *Int Dent J* 1991; **41**:279-86.
5. Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *S. mutans*. *Arch Oral Biol* 1982; **27**:861-8.
6. Scheie, AA. Modes of action of currently known chemical anti-plaque agents other than chlorhexidine. *J. Dent. Res* 1989; **68**:1609-1616.
7. Andersson MH, Shi, W. A probiotic approach to caries management. *Pediatric Dent* 2006; **28**(2):151-3; discussion 192-8.
8. Loesche WJ. Role of *S. mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; **50**:2118 – 2135.
9. Silva ACB, Cruz JS, Sampaio FC, Araújo, DAM. Detection of oral streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; **39**:648-651.
10. Kuramitsu HK. Virulence factors of *mutans* streptococci: role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol* 1993; **4**: 159-176.

11. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *S. mutans*. *Microbiol Rev* 1980; **44**: 331-384.
12. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine rinsing in previously plaque-free and plaque-covered surfaces. A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2007; **78** (11): 2127-2134.
13. Gjermo P, Eriksen HM. Unchanged plaque inhibiting effect of chlorhexidine in human subjects after two years of continuous use. *Arch.Oral Biol.* 1974; **19**:317–319.
14. Baehni PC Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Diseases* 2003; **9** Suppl 1: 23-9.
15. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *Journal of the American Dental Association* 2006; **137** (12):1649-57.
16. Andrews M J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; **48**, Suppl. S1, 5-16.
17. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gbpB* and their putative response regulators in several isolates of *S. mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008; **23**: 466–473.
18. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
19. Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In Vitro Susceptibility of *S. mutans* to chlorhexidine and Six Other Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 1158-1159.

20. Sampaio FC, Pereira MSV, Dias CS, Costa VCO, Conde NCO, Buzalaf MAR. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; **124**:289–294.
21. Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *S. mutans*. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent* 2007; 164-168.
22. Stanley A, Wilson M, Newman HN. The *in vitro* effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodont* 1989; **16**:259-264.
23. Russel AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 1993; **25**(4):229-38.
24. Tam A, Shemesh M, Wormser U *et al.* Effect of different iodine formulations on the expression and activity of *S. mutans* glucosyltransferase and frutosyltransferase in biofilm and planktonic environments. *J Antimicrobial Chemother* 2006; **57**: 865-871).
25. Wei G-X, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *S. mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57** (6): 1100-1109.
26. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; **28**:12-55.
27. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 2006; **34** (6 Suppl 1): 3S-10S discussion 64S-73S.
28. Shemesh M, Tam A, Feldman M, Steinberg D. Differential expression profiles of *S. mutans* *ftf*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydrate Research* 2006; **341**: 2090-2097.

29. Cury J, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Sreptococcus mutans* biofilms. *Analytical Biochemistry* 2007, **365**: 208–214.
30. Cury JA, Seils J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *S. mutans* in suspension cultures and biofilms. *Braz Oral Res* 2008; **22**(3):216-22.
31. Koo H, Seils J, Abranches J *et al.* Influence of Apigenin on *gtf* Gene Expression in *S. mutans* UA159. *Antimicrobial Agents Chemother* 2006; **50** (2): 542-546.
32. Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T *et al.* Differential and quantitative analysis of mRNA expression of glucosyltransferases from *S. mutans* MT8148. *J Dent Res* 2002; **81**: 109-13.
33. Wade WG. New aspects and new concepts of maintaining “microbiological” health. *Journal of Dentistry* 2010; **38**, S1; S21-S25.
34. Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry* 2010; **38**, S1; S11-S15.
35. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm pharmacol* 1964; **16**:655-62.
36. Radford JR, Homer KA, Naylor MN, Beighton D. Inhibition of human subgingival plaque protease activity by chlorhexidine. *Archs oral Biol* 1992; **31**(4):245-248.
37. Dunne WMJr. Bacterial adhesion: Sean any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 155-166.
38. Hope CK, Wilson M. Analysis of the Effects of chlorhexidine on Oral Biofilm Vitality and Structure Based on Viability Profiling and an Indicator of Membrane Integrity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; **48**(5): 1461-1468.

39. Tattawasart U, Hann AC, Maillard J-Y, Furr JR, Russel AD. Citological changes in chlorhexidine-resistant isolates of *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; **45**:145-152.
40. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005; **99**: 703-15.
41. Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmatic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 1966; **18**:569-78.
42. Longworth AR. Chlorhexidine, p. 95–106. In W. B. Hugo (ed.). Inhibition and destruction of the microbial cell. *Academic Press* 1971; Ltd., London, England.
43. Chawner JA, Gilbert P. A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine. *J Appl Bacteriol* 1989a; **66**: 243–252.
44. Chawner JA, Gilbert P. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. *J Appl Bacteriol* 1989b; **66**: 253–258.
45. Chawner JA, Gilbert P. Adsorption of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine to *Escherichia coli* cells and to isolated membrane components. *Int J Pharm* 1989c; **55**: 209–215.

Table legends

Table 1. Primer sequences used in this study (listed 5' to 3' end) and amplicon sizes.

Confidential: for peer review only

Figure legends

Figure 1. Growth of *S. mutans* planktonic cells (a) and biofilm (b) exposed to different concentrations of chlorhexidine (CHX). The arrows mean that the approximate value for MIC and MBC of CHX, in planktonic and biofilm cultures, respectively. Data are means \pm SD of three separate experiments run in duplicate. ** $p < 0.01$ as compared to control condition.

Figure 2. Validation of *16S rRNA* as a housekeeping gene in biofilm-forming cells of *S. mutans* exposed or not to chlorhexidine. Absolute *16S rRNA* Ct-values show relative constancy under different experimental conditions. Each point represents an independent experiment run in duplicate.

Figure 3. Influence of sub lethal concentrations of chlorhexidine (CHX) on the *gtfs* expression. Planktonic *S. mutans* cells were grown in absence (0, control) or presence (C2, 2.2 mg/L; C3, 4.5 mg/L) of CHX and subjected to qPCR analysis. mRNA levels of *gtfB*, *gtfC*, and *gtfD* in each sample were normalized by respective *16S rRNA*. Then, vehicle-treated controls were set at 100%, and levels for treatments (C2, C3) were expressed relative to this value. The results are expressed as the means \pm SD of three separate experiments run in duplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared to control condition.

Figure 4. Effects of sub-lethal and lethal chlorhexidine (CHX) pulse-exposition in *in vitro* *S. mutans* biofilms. (a) mRNA levels of *gtfB*, *gtfC*, and *gtfD* in each sample was normalized by respective *16S rRNA*. Vehicle-treated controls were set at 100%, and levels for treatments were expressed relative to this value. Reduction in *gtfs* expression were reached in concentrations ≥ 500 mg/L. (b) Cell counts and coefficient of variation from same batch used in (a), showing significant influences of CHX only in concentrations ≥ 500 mg/L. The results are expressed as the means \pm SD of three separate experiments run in duplicate. ** $p < 0.01$ as compared to control condition.

Figure 5. Scanning electron micrograph of planktonic *S. mutans* UA159 cells with and without treatment with chlorhexidine (CHX). Cells were exposed to CHX at 4.5 mg/L. Note that after 4 h and 6 h of CHX incubation, several wilted cells with spilled intracellular material could be observed (15 kV and 13.000x of magnification).

Figure 6. Scanning electron micrograph of *S. mutans* UA159 early biofilm, with and without treatment with chlorhexidine (CHX). Biofilms were exposed to CHX which was presented as a gradual decreasing in both the cells' chain length and their matrix when exposed at 1.1, 4.5 or 72 mg/L concentrations (15 kV and 1.300x of magnification).

Table 1. Primer sequences used in this study (listed 5' to 3' end) and amplicon sizes.

Primers (Q RT-PCR)	Sequence 5' - (Forward/Reverse)	Product size
16SRNA	CGGCAAGCTAATCTCTGAAA/GCCCCTAAAAGGTTACCTCA	190 bp
SMU.910 (<i>gtfD</i>)	TGATTCGTGGTATCGTCCTAA/GTTGAGACTTTCTTGGCTGCT	199 bp
SMU.1004 (<i>gtfB</i>)	CGAAATCCCAAATTTCTAATGA/TGTTTCCCAACAGTATAAGGA	197pb
SMU.1005 (<i>gtfC</i>)	ACCAACCGCCACTGTTACT/AACGGTTTACCGCTTTTGAT	161bp

Figure 1.

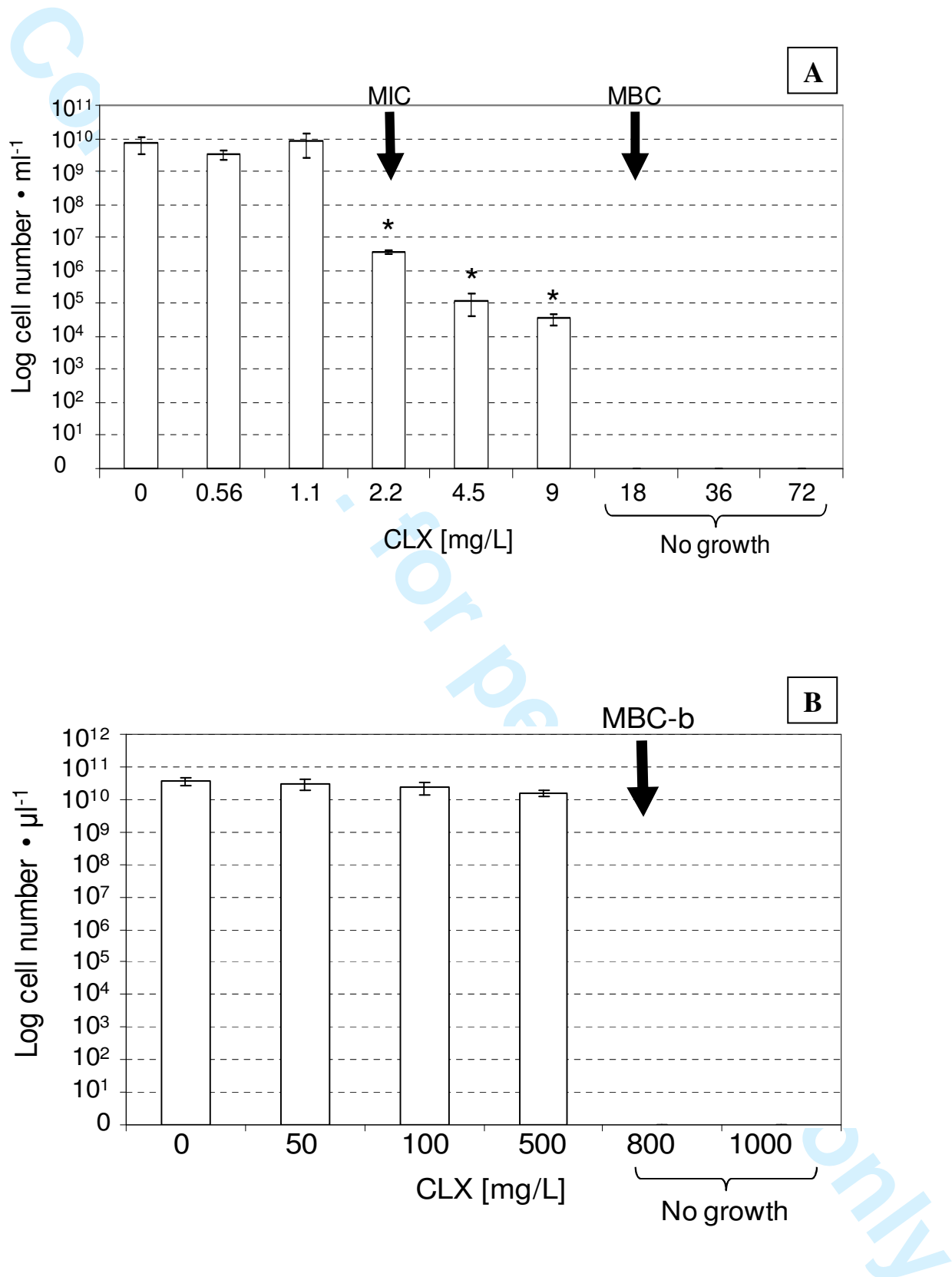
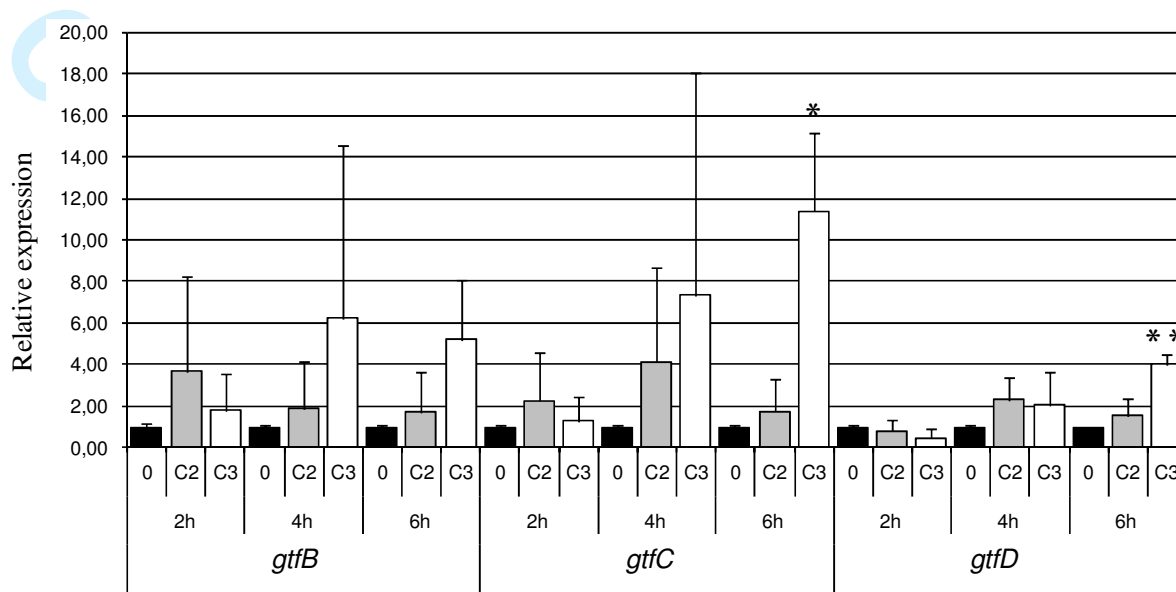


Figure 3.

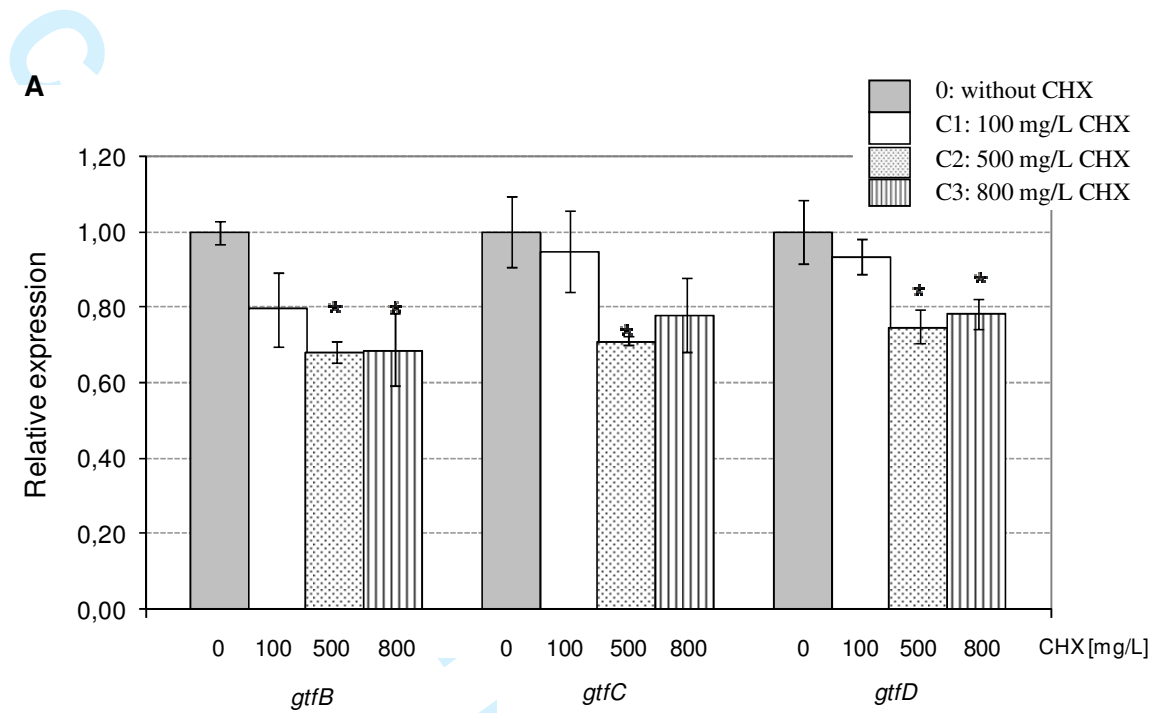


0: without CHX

C2: 2.2 mg/L CHX

C3: 4.5 mg/L CHX

Figure 4.



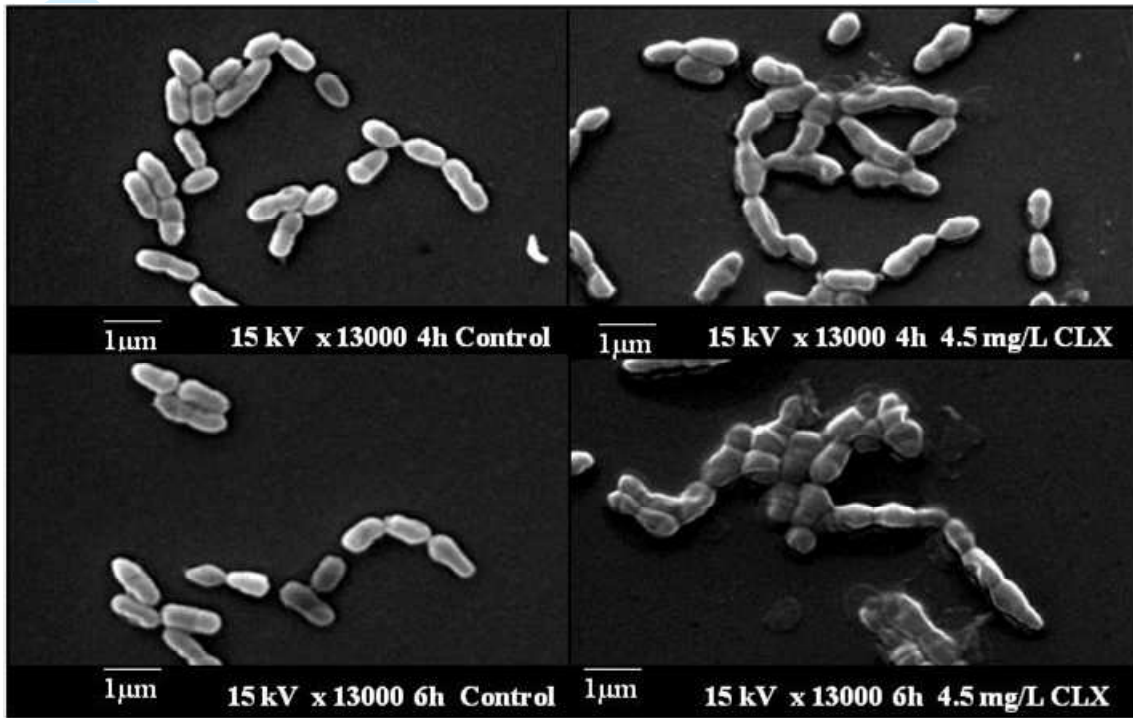
B

CHX [mg/L]	UFC/mL	Coefficient of variation	p-value
0 (control)	$1.9 \cdot 10^{12}$	21,9%	ns
100	$1.3 \cdot 10^{12}$	19,9%	ns
500	$3.6 \cdot 10^{11}$	56,4%	p<0.01
800	no growth	--	nd

nd: not determined

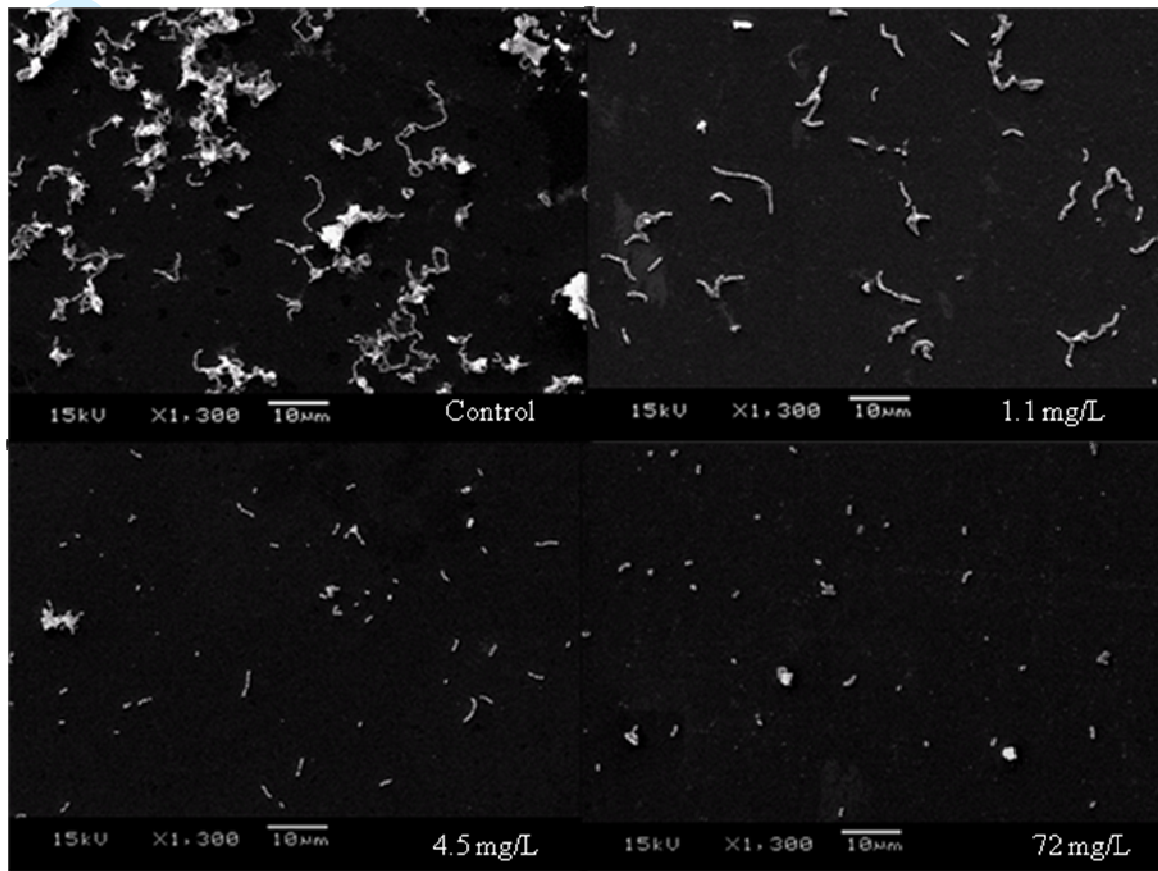
ns: no statistical difference

Figure 5.



or peer review only

Figure 6.



4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados deste trabalho, é lícito concluir que:

- Os *Streptococcus mutans* foram prevalentes nas crianças com e sem cárie dentária e não indicaram um risco direto para o desenvolvimento de lesões cariosas;
- A Concentração Bactericida Mínima (CBM) da clorexidina (CHX) em biofilmes foi cerca de 40 vezes maior que a CBM da CHX nas células plantônicas;
- As células plantônicas expostas à CHX foram reduzidas por 6 vezes ou mais a partir das concentrações acima da Concentração Inibitória Mínima (CIM), enquanto as células do biofilme, foram reduzidas por 2,5 vezes ou mais a partir das concentrações sub-CBM;
- A CHX aumentou a expressão de algumas *gtfs* nas células plantônicas, ao mesmo tempo em que diminuiu a expressão das *gtfs* nas células dos biofilmes;
- A CHX, em concentrações crescentes, provocou rompimento da membrana das células plantônicas, e diminuiu as cadeias celulares e a formação de matriz nos biofilmes iniciais;
- O efeito da CHX nos *S. mutans* depende do tipo de organização das células (plantônico ou biofilme), do padrão de crescimento e do tempo de exposição e concentração da droga.

A presença da microbiota bucal residente é essencial para a saúde oral, pois se esta microbiota for eliminada, podem ocorrer infecções provocadas por patógenos exógenos oportunistas (Wade, 2010). Deste modo, um desafio significativo para o futuro será o desenvolvimento de produtos que melhorem a condição clínica do paciente, por meio do controle adequado do biofilme patogênico, e ainda preservem os benefícios de uma microbiota oral residente normal (Marsh, 2010). O efeito de agentes antimicrobianos na expressão de genes que são fortemente envolvidos na formação do biofilme é de especial interesse para a Odontologia, pois estudos desta natureza podem indicar as doses adequadas de antimicrobianos orais para uso clínico.

Frente ao exposto, o objetivo da utilização de colutórios bucais contendo antimicrobianos, especialmente do ponto de vista clínico, não é a morte celular, mas sim o controle ou eliminação de mecanismos de virulência destes micro-organismos em biofilmes, como ocorre na cavidade bucal. Concentrações mais reduzidas de clorexidina nos enxaguatórios bucais também podem reduzir alguns dos efeitos adversos da droga, como o sabor desagradável, a pigmentação dos dentes e a alteração do paladar. Estudos futuros serão necessários para melhor se entender o mecanismo de desenvolvimento da cárie dentária em pacientes de risco à doença, assim como estudos sobre a ação da clorexidina, utilizando para este fim, técnicas moleculares e modelos de biofilme multiespécie, visando a determinação de concentrações ideais que permitam a presença de um biofilme dental associado à saúde.