



Exopolissacarídeos aumentam a acidogenicidade do biofilme de *S. mutans*

Palavras-Chave: Biofilme, Sacarose, Acidogenicidade

Autora: Viviann Sampaio Oliveira Veríssimo, FOP – UNICAMP

Coautor: Mateus Xavier de Queiroz, FOP – UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho, FOP – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O potencial cariogênico dos biofilmes não é ditado apenas pela acidogenicidade dos carboidratos (Cury et al., 2000). A organização do biofilme, por sua vez, também pode contribuir para sua cariogenicidade, principalmente quando este é formado a partir da sacarose. O potencial acidogênico da sacarose é comparável a outros carboidratos, como seus monômeros, glicose e frutose (Stephan, 1944; Bowen et al., 1966). No entanto, a sacarose, além de fermentável serve como substrato para a síntese de exopolissacarídeos (EPS) por glucosiltransferases produzidas por microrganismos bucais, a exemplo de *Streptococcus mutans* (Cury et al., 2000; Costa Oliveira et al., 2022).

EPS modifica a matriz extracelular do biofilme para uma mais viscosa e volumosa, permitindo maior adesão bacteriana (Dibdin e Shellis, 1988). Além disso, EPS aumenta a porosidade de biofilmes dentais, o que facilita a difusão dos carboidratos para porções mais profundas (Bowen e Koo, 2011; Koo et al., 2013), onde podem ser fermentados e os ácidos resultantes permanecem na interface dente-biofilme por períodos mais longos (Xiao et al., 2012), intensificando a desmineralização dental (Klein et al., 2015).

Assim, a sacarose tem um papel importante no aumento da cariogenicidade dos biofilmes devido às alterações dos EPS induzidas na matriz do biofilme. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar in vitro a capacidade dos EPS sintetizados a partir da sacarose em aumentar a acidogenicidade dos biofilmes quando expostos a carboidratos presentes na dieta humana.

METODOLOGIA:

Foi realizado um estudo experimental *in vitro* utilizando um biofilme de *Streptococcus mutans* (Amaechi et al., 2019) capaz de sintetizar polissacarídeos extracelulares quando exposto à sacarose (EPS+) ou não, quando exposto glicose e frutose (EPS-), monossacarídeos constituintes do primeiro.

Após a formação da película salivar, os biofilmes foram formados sobre os hemi-discos de hidroxiapatita utilizando caldo de extrato de levedura e triptona (UTYEB; pH 7.0). Posteriormente à adesão bacteriana, os hemi-discos foram imersos em meio de cultura contendo 1% de sacarose (EPS+) ou 0,525% de glicose + 0,525% de frutose (EPS-) durante 8 horas e, na sequência, eram transferidos para um meio UTEYB fresco contendo 0,1 mM de glicose por 16h (overnight). A formação dos biofilmes ocorreu 4 dias antes da avaliação da acidogenicidade.

Os biofilmes EPS+ e EPS- foram então expostos 5 vezes, com intervalos de 45 minutos, a um dos tratamentos (n=6): 0,9% de NaCl (controle negativo), 10% de sacarose (controle positivo) ou glicose + frutose 10,5%. O pH do meio de cultura foi avaliado após cada intervalo de 45 minutos (45, 90, 135, 180 e 225 minutos).

A fim de avaliar células viáveis, biomassa e EPS solúvel e insolúvel, biofilmes adicionais (n=6) também foram formados. A arquitetura do biofilme foi marcada para visualização de bactérias e EPS por microscopia confocal. Os fatores em estudo foram o tipo de biofilme (EPS+ e EPS-) e os tratamentos (NaCl, sacarose e glicose + frutose).

Finalmente, devido ao uso de saliva para a formação do filme salivar, o estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas - FOP/UNICAMP.

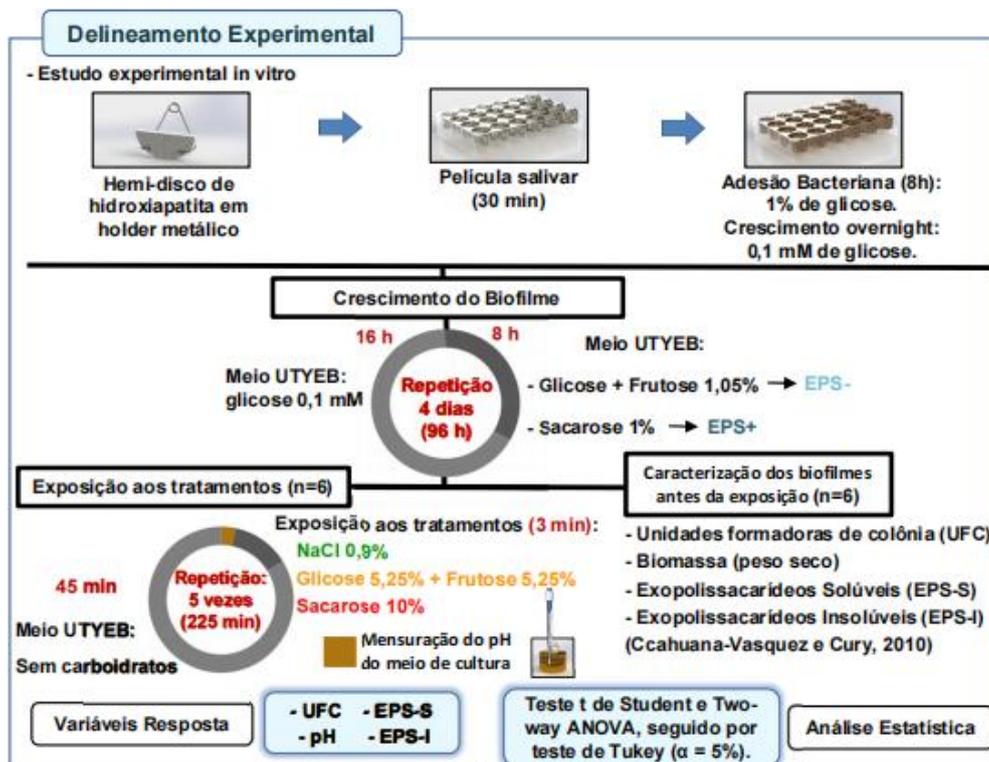


Figura 1: Delineamento experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na avaliação da viabilidade celular através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado que tanto os biofilmes EPS+ quanto os EPS- apresentaram quantitativos celulares semelhantes ($p > 0,05\%$). No entanto, na avaliação do peso seco houve diferença estatística para os biofilmes EPS+ ($p < 0,05\%$) que, uma vez apresentando maior peso, confirmaram que tal característica foi determinada pelo maior volume de matriz extracelular. Ademais, na avaliação da formação de exopolissacarídeos nos dois tipos de biofilme, só foi observada formação significativamente expressiva nos biofilmes EPS+. Tais informações foram sintetizadas na figura 2.

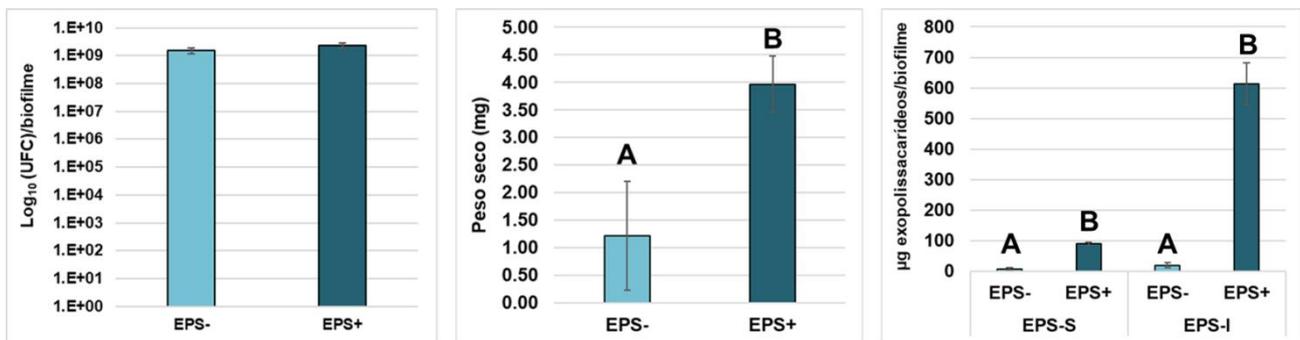


Figura 2. Caracterização dos biofilmes (n=6) antes da exposição de acordo com o tipo de biofilme, EPS- e EPS+. **A.** Contagem de UFC ($\text{Log}_{10}/\text{biofilme}$); **B.** Peso seco (mg); **C.** EPS solúvel e insolúvel ($\mu\text{g}/\text{biofilme}$).

Quanto às variações de pH do meio de cultura provocadas nos dois tipos de biofilmes, verificou-se, em todos os tempos avaliados (*), diferença estatística ($p < 0,05\%$) entre o grupo NaCl 0,9% e os demais. Ademais, conforme gráfico 1, apesar dos biofilmes EPS+ e EPS- apresentarem quedas de pH semelhantes, esta foi mais acentuada no grupo EPS+. Outrossim, os dados confirmam que o mesmo carboidrato quando associado a um biofilme mais poroso apresenta acentuação em sua queda de pH.

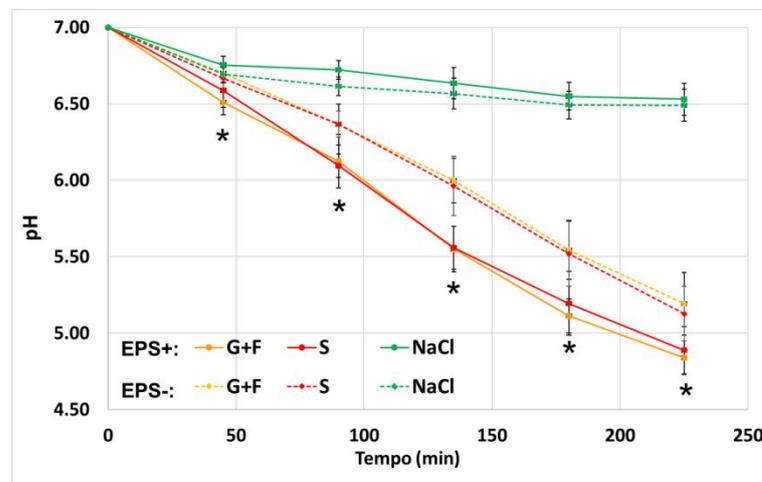


Gráfico 1. Média \pm DP (n=6) das variações de pH do meio de cultura provocadas pelos biofilmes EPS- e EPS+ expostos aos tratamentos ao longo do tempo.

Adicionalmente, uma análise qualitativa dos biofilmes EPS+ e EPS- foi realizada na comparação realizada na figura 3, a qual traz o aspecto macroscópico desses biofilmes após as exposições aos tratamentos. Através dela foi possível observar o maior volume dos biofilmes EPS+.

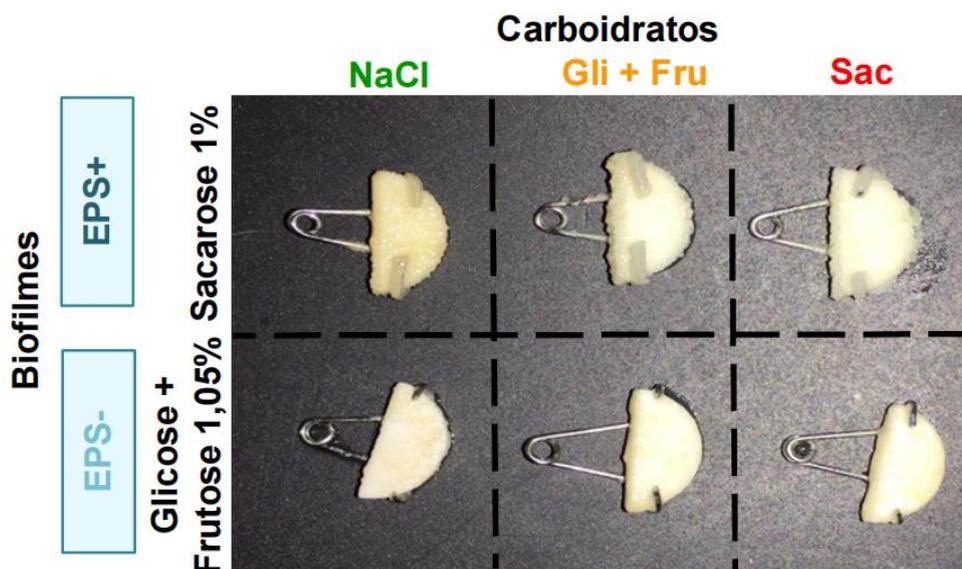


Figura 3. Biofilmes EPS+ e EPS- após exposição aos tratamentos.

CONCLUSÕES:

Os resultados sugerem que matrizes extracelulares ricas em EPS aumentam a acidogenicidade de carboidratos da dieta em biofilmes de *S. mutans*.

BIBLIOGRAFIA

1. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. **Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose.** Caries Res. Karger Publishers; 2000;34(6):491
2. Ricomini Filho AP, de Assis ACM, Costa Oliveira BE, Cury JA. **Cariogenic Potential of Human and Bovine Milk on Enamel Demineralization.** Caries Res. 2021;55(4):260-267
3. Dibdin GH, Shellis RP. **Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content.** J Dent Res. 1988; 67(6): 890-5.
4. Bowen WH, Koo H. **Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms.** Caries Res. 2011;45(1):69-86.
5. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. **The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm.** J Dent Res. 2013 Dec;92(12):1065-73.
6. Xiao J, Koo H. **Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms.** J Appl Microbiol. 2010 Jun;108(6):2103-13.

7. Amaechi BT, Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Cury JA. **Protocols to Study Dental Caries In Vitro: Microbial Caries Models.** *Methods Mol Biol.* 2019;1922:357-368.